

FUNKTION UND VERSTOFFWECHSLUNGEN VON
PMN - GRANULOCYTEN IN CPDA₁ - VOLLBLUTKONSERVEN
IN ABHÄNGIGKEIT DER LAGERUNGSDAUER
UNTER STANDARDBLUTBANKBEDINGUNGEN

RICHARD WIMMER

1987

Disbui. München



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0108



Aus der III. Medizinischen Klinik der Universität München
Klinikum Großhadern

Vorstand Prof. Dr. med. W. Wilmanns

Funktion und Verstoffwechslungen von PMN - Granulocyten
in CPDA₁ - Vollblutkonserven in Abhängigkeit der
Lagerungsdauer unter Standardblutbankbedingungen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians Universität zu
München

vorgelegt von

Richard Wimmer

aus
München

1987

mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. W. Mempel

Mitberichterstatter : Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 19. 11. 1987

Gewidmet

meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit
für treue Unterstützung
auf meinem Lebensweg

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Ziel der Arbeit	4
3. Material und Methoden	5
3.1. Spender und Blutabnahme	5
3.2. Granulocytenzählung	6
3.3. Phagocytose - Test	6
3.4. Chemotaxis	9
3.5. Bestimmung von C_{3a} des Arg/ C_{5a} des Arg	11
3.6. Bestimmung von PMN - Elastase, Myeloperoxidase und Laktoferrin	13
3.7. Bestimmung der Lactatdehydrogenase	14
4. Ergebnisse	15
4.1. Leukocytenzahl in den CPDA ₁ - Vollblutkonserven	15
4.2. Phagocytose	17
4.3. Chemotaxis	21
4.3.1. Ermittlung der optimal chemo- taktisch wirksamen Peptidkonzentration von F-Meth-Leu-Phen-Phen	21
4.3.2. Chemotaktische Funktionstüchtigkeit von Granulocyten in CPDA ₁ - Vollblutkonserven	23
4.4. Konzentration von C_{3a}/C_{5a} des Arg in CPDA ₁ Vollblutkonserven	29

4.5.	Konzentration von Elastase in der CPDA ₁ Vollblutkonserve	34
4.6.	Konzentration von Myeloperoxidase in CPDA ₁ Vollblutkonserven	38
4.7.	Konzentration von Laktoferrin in CPDA ₁ Vollblutkonserven	41
4.8.	Konzentration von LDH in CPDA ₁ Vollblutkonserven	44
5.	Diskussion	
5.1.	Wahl des Antikoagulans für die Blutkonserve	46
5.2.	Funktion der Granulocyten in der CPDA ₁ Vollblutkonserve	46
5.2.1.	Änderung der Konzentration der Leukocyten	46
5.2.2.	Phagocytose der Leukocyten	48
5.2.2.1.	Problematik der Bestimmung der Phagocytose	48
5.2.2.2.	Beeinflussung der Phagocytose	49
5.2.2.3.	Änderung der Phagocytosefähigkeit von PMN-Leukocyten in CPDA ₁ - Vollblutkonserven während der Lagerung	50
5.2.3.	Chemotaxis der PMN-Granulocyten	52
5.2.3.1	Problematik der Bestimmung der Chemotaxis	52
5.2.3.2.	Beschreibung der benutzten Kammer	52
5.2.3.3.	Beschreibung der Filter	53
5.2.3.4.	Beschreibung der chemotaktischen Substanzen	53
5.2.4.	Änderung der Chemotaxis von PMN-Granulocyten in der CPDA ₁ Vollblutkonserve	54

5.3.	Aktivierung des Komplementsystems in der CPDA ₁ Vollblutkonserve	56
5.3.1.	Die Komplementkaskade und ihre Aktivierung	56
5.3.2.	Stoffwechselwirkungen von C _{3a} und C _{5a}	58
5.3.3.	Stoffwechselwirkungen von C _{3a} des Arg und C _{5a} des Arg	58
5.3.4.	Konzentrationsverlauf von C _{3a} des Arg und C _{5a} des Arg in der CPDA ₁ Vollblutkonserve unter Lagerung	59
5.3.5.	Konsequenzen aus der erhöhten Konzentration von C _{3a} des Arg in älteren Vollblutkonserven	64
5.4.	Granulozytäre Enzyme in der CPDA ₁ Vollblutkonserve	64
6.	Zusammenfassung	67
9.	Literaturverzeichnis	68

1. Einleitung

Erst seit der Entdeckung der Blutgruppenantigene auf Erythrocyten durch Landsteiner im Jahre 1920 und der Entwicklung nicht toxischer Antikoagulantien wurde eine breite klinische Anwendung von Bluttransfusionen ermöglicht. Infolge des 2. Weltkrieg kam es zu einem gewaltigen Anstieg im Verbrauch von Vollblutkonserven und Blutkomponenten. Besonders die Entwicklungen in der Chirurgie und die Therapie von Carcinomen durch Chemotherapie oder Bestrahlung trugen sehr zur heutigen Bedeutung der Transfusionsmedizin bei (32).

Auch wenn Bluttransfusionen heute zur klinischen Routine gehören, so verbleibt doch eine Vielfalt an möglichen Komplikationen. Einige hiervon sind in Tabelle 1 aufgelistet (8).

Tabelle 1:

- Übertragung von Krankheiten (Hepatitis, AIDS)
- Übertragung von inkompatiblen Blutgruppenantigenen
- Immunisierung des Empfängers
- Änderung der Hämostase
- Mikroembolisierung
- Hypothermie
- Infusion von denaturierten und vasoaktiven Substanzen
- abgeschwächte Affinität des Hämoglobins für O_2
- Hämolyseprodukte
- verminderte Deformabilität der Erythrocyten
- erhöhter Kalium- Phosphat- und Ammoniumspiegel
- abgeschwächte bakterielle Abwehr

Das funktionelle und morphologische Verhalten der Erythrocyten, die Konzentration von Elektrolyten und Antikoagulantien in der Konserve sind unter Blutbank-Bedingungen häufig untersucht worden (32). Mit einer Blutkonserve werden jedoch nicht nur Erythrocyten transfundiert, sondern auch Leukocyten bzw. deren Abbauprodukte. Welche Rolle diese bei der Transfusion von Vollblut spielen, ist in oeringerem Umfang untersucht worden. Mögliche erwünschte aber auch unerwünschte Wirkungen lassen sich theoretisch aus der physiologischen Funktion dieser Zellen bzw. ihrer Stoffwechselprodukte herleiten.

Bakterielle, entzündliche Gewebsreaktionen initiieren eine Freisetzung von chemotaktisch aktiven Substanzen durch Aktivierung des Komplementsystems, des Kininsystems, des Blutgerinnungssystems und rufen somit eine Wanderung von abwehrkompetenten Zellen zum Ort des Geschehens hervor. Antikörper greifen zusammen mit Komplementfaktoren aus dem Plasma antigene Strukturen an und schaffen so die Voraussetzung zur Aufnahme in den Phagocyten. An Hand spezieller Rezeptoren auf der Phagocytenoberfläche wird das opsonierte Antigen erkannt, an die Zelloberfläche gebunden und mittels Phagocytose internalisiert (49). Cytoplasmatische Granula vereinigen sich mit dem Phagosom und schütten ihren Inhalt in das Phagosom aus. Diese Degranulierung führt zu einer Stimulierung des cellulären oxidativen Metabolismus, und zur Aktivierung der Myeloperoxidase, des Laktoferrins, der Elastase und anderer lysosomaler Enzyme. Dies ist mit einer partiellen Reduktion von molekularen O_2 verbunden und führt zur Bildung hochreaktiver Radikaler mit mikrobiozider Wirkung (1).

Außerhalb der Phagocyten ist der proteolytischen Aktivität der lysosomalen Enzyme einschließlich der Elastase durch Proteinaseinhibitoren, zu 92% durch α_1 -Antitrypsin und zu 8% durch α_2 -Makroglobulin, vorgebeugt, die sowohl in Plasma, interstitieller Flüssigkeit und Körpersekreten in hoher Konzentration vorkommen (18,27).

Neben ihrer Hauptwirkung, der Spaltung von Elastin und Proteoglykan, wobei Aminosäurebindungen zwischen Valin und Methionin gespalten werden, aktiviert Elastase die Fibrinolyse und das Komplementsystem über den alternative pathway (44).

Dies führt zu einer Spaltung von C_3 zu C_{3a} und C_{3b} , das dann die weitere kaskadaenartige Aktivierung des Komplementsystems von C_5 nach C_9 bewirkt. C_{3a} und C_{5a} , beides Spaltprodukte, gelten als Anaphylatoxine. Die niedrig molekularen Peptide (C_{3a} 8900 Dalton, C_{5a} 15000 Dalton) bewirken eine Kontraktion glatter Muskulatur, Freisetzung von Histamin aus Mastzellen, gesteigerter Kapillardurchlässigkeit und Ödemen; C_{5a} gilt darüberhinaus als chemotaktisches Agens für neutrophile Granulocyten und fördert die Freisetzung von Hydrolasen aus den Granula dieser Zellen (55).

Friedenberger beobachtete als erster, daß die systemische Applikation dieser Produkte Reaktionen hervorruft, die einem anaphylaktischen Schock gleichen (21).

Es ist daher sicherlich von praktischen Interesse, ob in Blutkonserven derartige proteolytisch bedingte Reaktionen ablaufen.



2. Ziel der Arbeit

Diese Arbeit soll dazu beitragen, Verstoffwechselungen innerhalb der Konserve genauer zu erforschen und somit den besten Zeitpunkt für die Transfusion einer Vollblutkonserve zu bestimmen.

Nachdem die Funktion der Erythrocyten und die Konzentration von Elektrolyten und Gerinnungsparametern unter den selben Gesichtspunkten bereits bestimmt worden sind, soll hier die Funktion neutrophiler Granulozyten -Chemotaxis, Phagocytose -, die Freisetzung von Proteinasen und Hydrolasen und die Entstehung eventuell toxischer Proteine wie der Anaphylatoxine C_{3a} und C_{5a} in CPDA₁ Vollblutkonserven untersucht werden. Insbesondere soll hierbei der Einfluß der Lagerungsdauer bei 4°Celsius herausgearbeitet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Spender und Blutentnahme

Zur Bestimmung der Phagocytose und der Chemotaxis wurden jeweils 500 ml Blut gesunden Klinikpersonal und Studenten mittels Venenpunktion abgenommen. Das Blut wurde in CPDA₁ Blutbeuteln gesammelt. Es wurde darauf geachtet, daß das Blut sorgfältig mit dem Stabilisator vermischt wurde. Die Blutkonserve wurde in erschütterungsfreie Kühlschränke gestellt, die eine ständige Kühlung zwischen 4°C und 6°C gewährleisten.

Die Bestimmung der Komplementfaktoren und der granulocytären Enzyme wurde aus den Piloten von CPDA₁ Blutkonserven durchgeführt, die dem Transfusionszentrum vom BRK - München mit dem routinemäßigen Zustelldienst überbracht wurden.

Je nach zu untersuchender Lagerungsdauer wurde den Konserven bzw. den Piloten zu verschiedenen Zeitpunkten nach sorgfältiger und vorsichtiger Durchmischung die für die jeweilige Untersuchung benötigte Blutmenge in einer sterilen Werkbank im "laminar air flow" entnommen.

CPDA₁ Blutbeutel : 500 ml Fassungsvermögen, 70 ml Stabilisatorflüssigkeit, Fa.Travenol München
100 ml Stabilisator enthalten :
300 mg Citronensäure, 2,63 g Natriumcitrat
2,90 g Glucose, 2,51 mg Natriumdihydrophosphat
27,5 ng Adenin, Aqua iniectionabile ad 100 ml

3.2. Granulocytenzählung

3.2.1. Material:

- Leukocytenpipetten
- Türksche Lösung (1-3% Essigsäurelösung mit Gentaviolett)
- Neubauerzählkammer

3.2.2. Methodik:

Die Leukocytenzählung in der Neubauerkammer wurde entsprechend klinischer Routinemethodik durchgeführt (45)

3.3. Phagocytose - Test

3.3.1. Material:

- Standard -I-Nähragar
- Staphylococcus aureus (S 52/A)
- 6% Dextranlösung
- 0,9% NaCl
- Hanksche Lösung
- Blutzuckerpipetten

3.3.2. Methodik:

3.3.2.1 Testvorbereitung

Am Vortag der Versuchsdurchführung werden die Agarplatten gegossen. 2 Röhrchen Standard -I-Boullion werden mit Staphylococcus aureus (S 52/A) beimpft und über Nacht bebrütet. Das Bakterium wurde vorher bei -70°C gelagert.

3.3.2.2 Testdurchführung

Zum Test benötigt man 10 ml Konservenblut und 10 ml Heparinblut einer gesunden Kontrollperson. Im Verhältnis 2:1 wird das Blut mit 6% Dextran gemischt und für 30 - 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Sedimentation der Erythrocyten wird der Überstand abpipettiert und 10 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in Hankscher Lösung und 10 minütigem Zentrifugieren bei 900 U/min werden die Granulocyten in 5ml Hankscher Lösung aufgenommen und nach Zählen in der Neubauerkammer auf eine Konzentration von 5×10^6 /ml eingestellt.

Das über Nacht bebrütete Bakterium wird bei 2500 U/min abzentrifugiert und 2 mal in 0,9% NaCl gewaschen. Die Konzentration von 10^8 Staphylococcen/ml wird durch 10 fache Verdünnung mit Hankscher Lösung der mit dem Spektralphotometer auf einen Extraktionswert von 0,200 eingestellten Lösung erreicht.

Im Anschluß hieran werden nacheinander Hanksche Lösung, Kontroll- und Patientenserum (1:5 verdünnt), Granulocyten und Bakterien in die Testreagenzgläser entsprechend folgendem Schema pipettiert.

Reagenzglas- Segmentkernige Bakterien Serum Puffer
nummer (5×10^6 /ml) (10^8 /ml) 20%

A	0,5ml Konserve	0,1 ml	0,4 ml
B	0,5ml Kontrolle	0,1 ml	0,4 ml
C		0,1 ml	0,4 ml 0,5 ml
D	0,5ml Konserve	0,1 ml	0,4 ml
E	0,5ml Kontrolle	0,1 ml	0,4 ml

Aus den Ansatzröhrchen werden sofort 5 ul in mit 5ml Aqua dest. gefüllte Röhrchen gegeben und bei 37°C für 5 Minuten gemengt. 50 ul aus den Aquaröhrchen werden mit Blutzuckerpipetten auf je zwei Agarplatten ausgestrichen und die Platten über Nacht inkubiert. Dieses Vorgehen wird nach 60 und 120 Minuten wiederholt.

3.3.2.3 Testauswertung

Am nächsten Tag werden die Kolonien ausgezählt und nachfolgende Graphik erstellt.

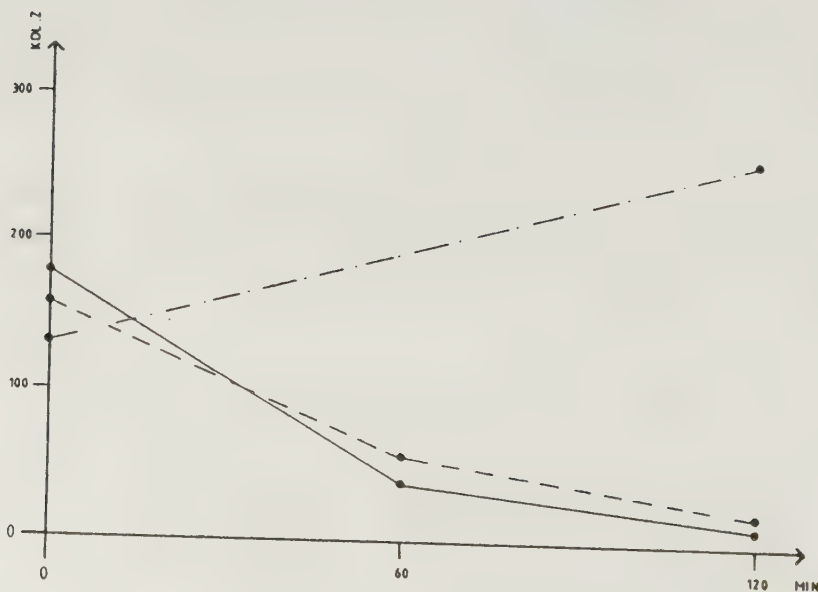


ABBILDUNG 1

3.4 Chemotaxis

3.4.1 Material

- 6% Dextran Lösung
- Hanksche Lösung
- 0,9% NaCl Lösung
- 3,6% NaCl Lösung
- 10^{-6} molare Peptidlösung Formylmethionin -
Leucin - Phenylalanin - Phenylalanin
in Äthanol gelöst
(Fa. Amersham, 3300 Braunschweig Gieselweg 1
Code TRK 763)
- modifizierte Boyden Kammer (Neuro Probe,
Instruments for research, Paesel GmbH Co.
Borsigallee 6 6000 Frankfurt 63)
- Diff - Quick
- Methanol

3.4.2 Methodik

3.4.2.1 PMN - Separation

20 ml CPDA₁ Blut werden im Verhältnis 3:1 mit 6% Dextranlösung gemischt und 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Das leukocytenreiche Plasma wird abgehoben, mit 6 Teilen kalter HBSS - Lösung gemischt, 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und dann in 5 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Die noch verbliebenen Erythrocyten werden mit 24 ml H₂O dest. 20 Sekunden hämolysiert. Anschließend wird mit 3,6% NaCl wieder Isotonie hergestellt. Die Zellsuspension wird 2 x mit 50 ml kalter HBSS - Lösung gewaschen, darauf 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und abschließend auf 5×10^5 PMN/ml eingestellt

3.4.2.2 Präparation der Boyden Kammer

Die untere Kammer, deren Löcher jeweils 25 μ l fassen, wird mit 10^{-6} molarer F-Meth-Leu-Phen-Phen - Lösung oder mit HBSS - Lösung gefüllt. Nachdem der Polycarbonat - Filter mit der glänzenden Seite nach unten auf die untere Kammer und eine Silikonichtung darüber gelegt wurde, wird der obere Teil der Kammer aufgesetzt. Die Kammer wird kurzzeitig bei 37°C aufgewärmt. Daraufhin wird der obere Kammerteil mit jeweils 50 μ l der Zellsuspension gefüllt und für 45 Minuten inkubiert. Beim Auflegen des Filters und Füllen des oberen Kammerteils muß sorgfältig die Entstehung von Luftblasen vermieden werden.

3.4.2.3 Bestimmung der Chemotaxis

Nachdem der obere Kammerteil so entfernt wurde, daß die zuerst zur Peptidlösung gewandte Seite nach oben zeigt, wird die andere Seite des Filters 3 mal mit HBSS - Lösung gewaschen. Der Filter wird mit Methanol fixiert, luftgetrocknet, mit Diff - Quick gefärbt und feucht auf einen Objektträger gebracht. Unter 40-facher Vergrößerung werden die durch den Filter gewanderten Granulocyten in jeweils 5 Gesichtsfelder nach der leading front Methode (4) ausgezählt.

3.5 Bestimmung von C_{3a} des. Arg. / C_{5a} des. Arg.

3.5.1 Material:

- H_2O dest.
- 0,9% NaCl
- Radioimmunoassay (J 125) C_{3a} des. Arg.
 C_{5a} des. Arg.

(Fa. Biosigma 8000 München 70, Gräffelfingerstr. 133 A)

Die benützte Assays reagieren nicht kreuz mit den Komplementfaktoren C_3 und C_5 , zeigen aber 100% Kreuzreaktion mit C_{3a} und C_{5a} (52,53)

3.5.2 Methodik

450 ml CPDA₁ Blut werden mit 450 ml eines dem Assay beigefügten ausfällenden Agens gemischt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 15 Minuten bei 7000 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Nach folgendem Schema werden die Reagenzgläser daraufhin pipettiert:

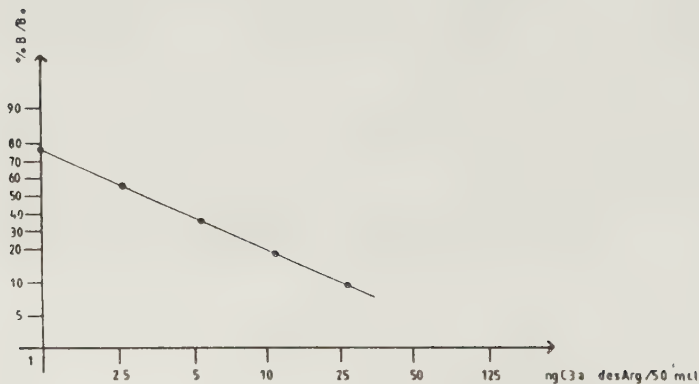
Reagenzglas- Puffer NaCl Standards Serum ^{125}J 1.AK
nummer

gesamte					
radioaktive	50	ul		50	ul
Aktivität					
unspezifische	50	ul	100	ul	50
O-Standard	50	ul	50	ul	50
Standard A-E	50	ul		50	ul
Probennr.	50	ul		50	ul

Der Ansatz wird mit 4 - fach Werten durchgeführt.
 Nach 30 minütiger Inkubation für C_{3a} des Arg und dreistündiger Inkubation für C_{5a} des Arg wird allen Proben mit Ausnahme derer, die die Gesamtaktivität bestimmen 50 μ l des 2. Antikörpers und nach weiterer 30 minütiger Inkubation 2 ml NaCl hinzugegeben. Bei 2000 g werden diese Röhrchen 10 Minuten lang zentrifugiert und nach Verwerfung des Überstands 2 Minuten lang in einem Gamma - Counter gemessen.
 Anschließend wird die Bindung der einzelnen Standards in Prozent ermittelt :

$$\text{Standard} - \text{unspezifische Bindung} \times 100 \\
 0 - \text{Standard} - \text{unspezifische Bindung}$$

Zur Erstellung der Standardkurve werden die Prozentzahlen auf einer Logit - Skala (1) aufgetragen (Abb. 2).



SAMPLE STANDARD CURVE

ABBIIDUNG 2

Anschließend erfolgt die Bestimmung der Probenkonzentrationen durch die Errechnung des Prozentsatzes der Bindung der Proben :

$$\frac{\text{Probe} - \text{unspezifische Bindung}}{0 - \text{Standard} - \text{unspezifische Bindung}} \times 100$$

Durch Interpolierung der jeweiligen Prozentwerte auf der Standardkurve und Multiplikation des graphischen Wertes mit dem Faktor 40, wobei die Verdünnung der Probe berücksichtigt ist, erhält man den Konzentrationswert in ng/ml.

3.6. Bestimmung von PMN - Elastase, Myeloperoxidase und Laktoferrin

3.6.1 Material

- PMN - Elastase Merck Immunoassay (Art.Nr.15689)
- Myeloperoxidase Merck Immunoassay
- Laktoferrin Merck Immunoassay
- E.coli Endotoxinlösung

3.6.2 Methodik

3.6.2.1 spontane Konzentration lysosomaler Enzyme

Plasma von 1 ml CPDA₁ Blut wird an Hand des in Abbildung 3 gezeigten Testsystems verarbeitet. Bei der Gewinnung des Plasmas dürfen keine Zellen abpipettiert werden

3.6.2.2 durch Endotoxin stimulierte Konzentration lysosomaler Enzyme

Jeweils einem ml CPDA₁ Blut werden 20 µl einer Endotoxinlösung (50 µg/ml bzw. 25 µg/ml) zugegeben, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und 10 Minuten unter 3000 U/min zentrifugiert.

Das Plasma wird wie in Abbildung 3 beschrieben verarbeitet.

TESTPRINZIP ENZYM IMMUN ASSAY ZUR
BESTIMMUNG VON ELASTASE, M. L.

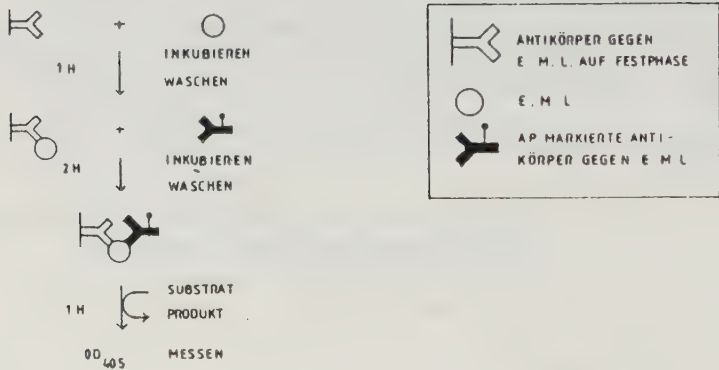


ABBILDUNG 3

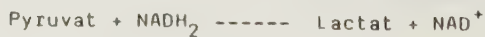
3.7 Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH)

3.7.1 Material

- Merck 1 Test Lactatdehydrogenase (Art.Nr.3349)
Reagenziensatz Merck
- Spektralphotometer (340 / 366 nm)

3.7.2 Prinzip

Laktatdehydrogenasen katalysieren die Reduktion von Pyruvat durch NADH_2 nach folgender Gleichung



Als Meßgröße dient die Abnahme der NADH_2 Konzentration (45).

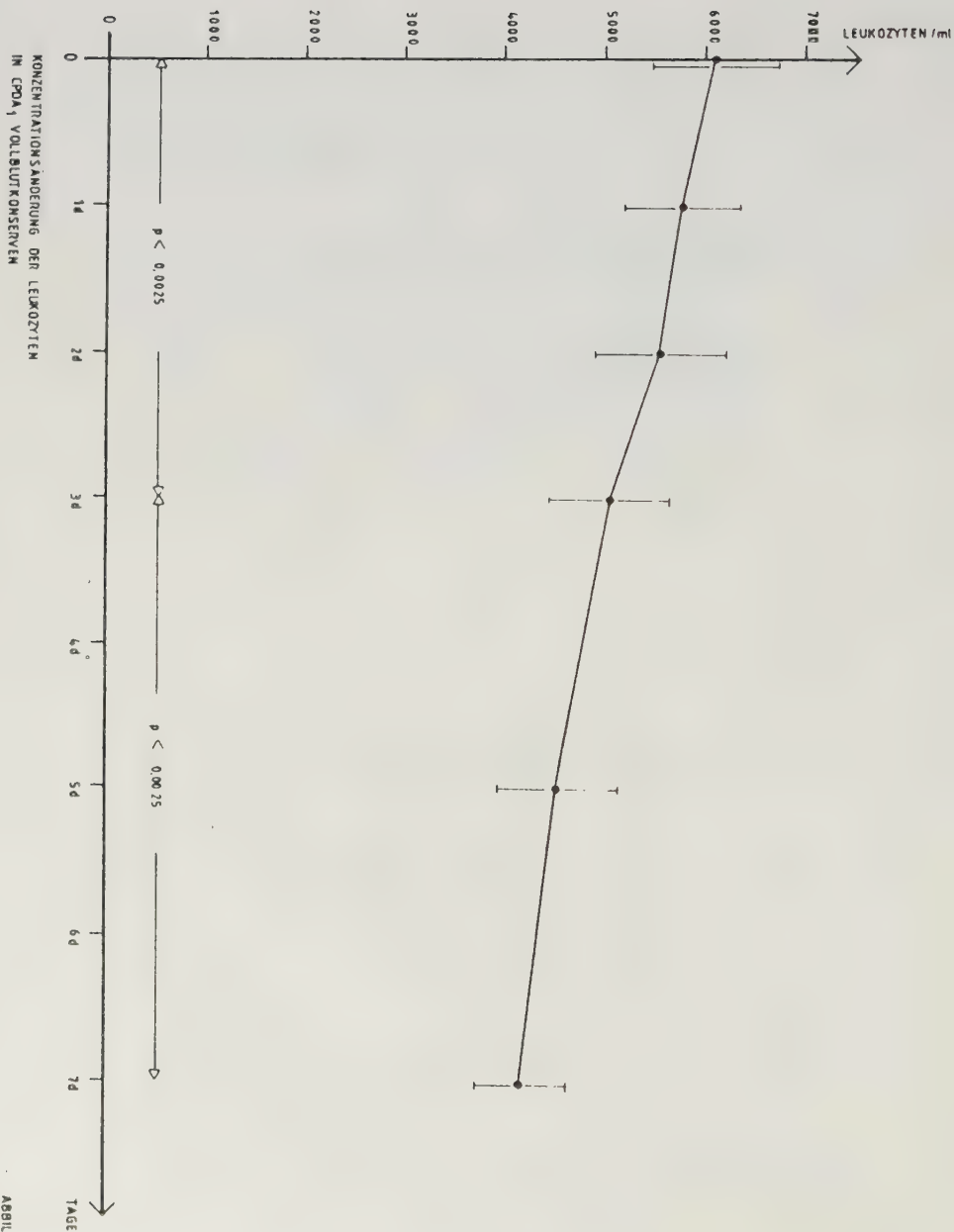
4.1 Leukocytenzahl in den CPDA₁ Vollblutkonserven

Am Abnahmetag, einen und zwei Tage danach wurden in 15 CPDA₁ - Vollblutkonserven, am Tag 3,5,7 in jeweils 10 Konserven die Leukocytenzahl/ml bestimmt.(vgl. 3.1.) In allen Konserven wurde ein kontinuierlicher Leukocytenabfall beobachtet (Tab. 2). Von einem Mittelwert von 6060/ml $\pm$ 630 am Abnahmetag fielen die Leukocyten auf 4160/ml $\pm$ 456 am Tag 7 ab (Abb. 4). Somit kann ein signifikanter kontinuierlicher Abfall während der Lagerungszeit von einer Woche festgestellt werden.

Tabelle 2:

Lagerungs- zeitraum	0d	1d	2d	3d	5d	7d
Konserven						
1	5375	5200	4800	4450	4375	4050
2	6200	5925	5900	5625	5475	4825
3	6475	6300	6200	6125	5350	4725
4	4850	4700	4600	4375	4050	4025
5	5200	5000	4450	4300	3950	3775
6	5875	5250	5200	5000	4850	4000
7	5950	5250	4800	4750	4625	4100
8	5800	5550	5375	5075	3850	3650
9	5650	5450	5250	5075	4050	3675
10	6300	6150	6000	5650	5125	4800
11	6725	6350	5900			
12	6075	5850	5700			
13	7025	6525	6400			
14	6475	6350	6100			
15	6950	6500	6350			
x	6060	5760	5530	5040	4570	4160
s	<u>+630</u>	<u>+573</u>	<u>+652</u>	<u>+607</u>	<u>+605</u>	<u>+456</u>

Leukocytenzahl/ml in CPDA₁-Vollblutkonserven über den Lagerungszeitraum einer Woche (Mw + s)



4.2

Phagocytose

Vier CPDA₁ Vollblutkonserven wurden sofort nach Herstellung, nach 6 stündiger, 1,2,3,4,7 tägiger Lagerung im Hinblick auf die Phagocytosefähigkeit ihrer Granulocyten untersucht. Die Untersuchung erfolgte semiquantitativ wie in Abschnitt 3.2. beschrieben.

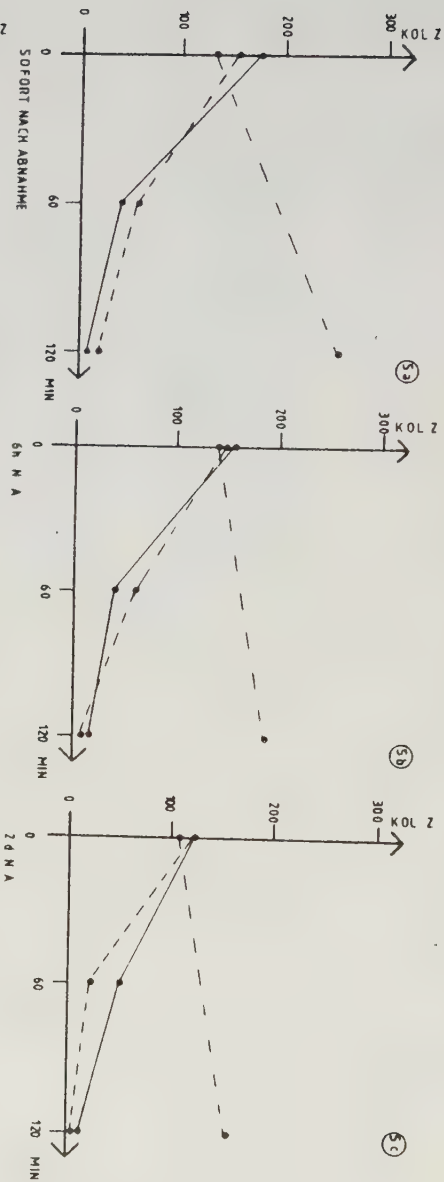
Die Abbildungen 5a-f zeigen exemplarisch den Verlauf der Phagocytosefähigkeit der Granulocyten einer Konserve.

Die sofort nach Blutentnahme getesteten Granulocyten phagocytierten 97% der Bakterien innerhalb von zwei Stunden; d.h. es wurde ein Abfall von durchschnittlich 132 ± 33 Kolonien auf ± 4 Kolonien gefunden. Nach 6 Stunden blieb die Phagocytosefähigkeit mit 95% abgetöteter Kolonien dem Ausgangswert und dem Kontrollwert gleichbleibend. Ebenso änderte sich einen Tag später mit 90% an phagocytierten Bakterien gering an der Funktion. Über 88% Phagocytose am 2. Tag und 78% am 3. Tag fiel die Phagocytose auf 52% am 4. Tag ab. Nach 7 Tagen fand dann keine Hemmung des Bakterienwachstums mehr statt (Abb. 6/7; Tab.3), sondern es kam zur Zunahme der Kolonienzahl von 118 ± 7 nach zweistündiger Inkubation auf 140 ± 14 Kolonien.

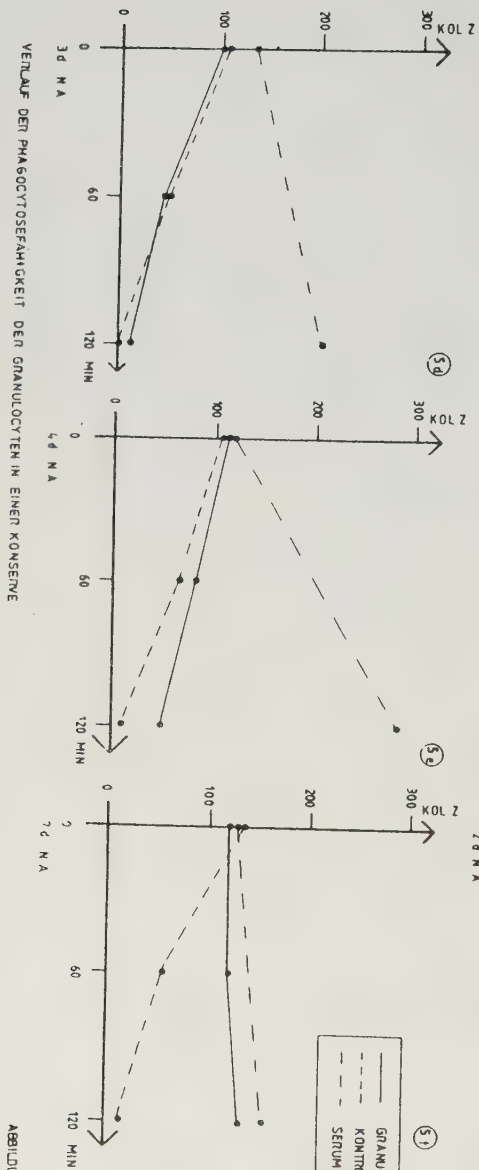
Tabelle 3:

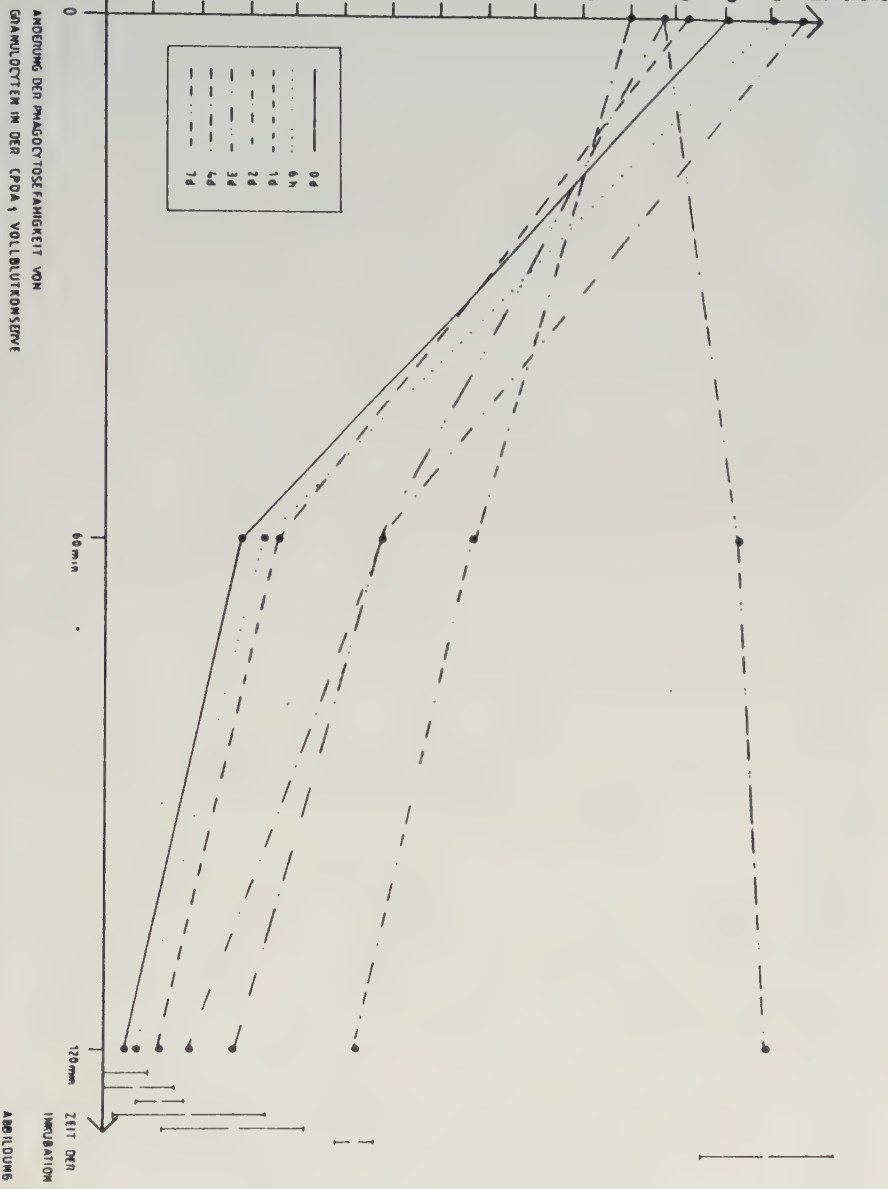
Konserven- alter	ohne Inkubation	Bakterienkolonien		Phagocytose- rate
		nach 60 min. Inkubation	nach 120 min Inkubation	
0d	132 (+ 33)	28 (+ 20)	4 (+ 5)	96,9 %
6h	141 (+ 21)	33 (+ 10)	7 (+ 8)	95,0 %
1d	123 (+ 8)	36 (+ 2)	12 (+ 5)	90,0 %
2d	147 (+ 42)	58 (+ 36)	18 (+ 16)	88,0 %
3d	118 (+ 16)	58 (+ 16)	27 (+ 15)	77,2 %
4d	110 (+ 9)	77 (+ 5)	53 (+ 4)	51,8 %
7d	118 (+ 7)	134 (+ 21)	140 (+ 14)	0 %

Verlauf der Phagocytosefähigkeit der Granulocyten in CPDA₁-Vollblutkonserven (Mw + s)



— GRANULOZYTEN AUS D KONSENZE
 --- KONTROLLGRANULOZYTEN
 ···· SERUM OHNE GRANULOZYTEN





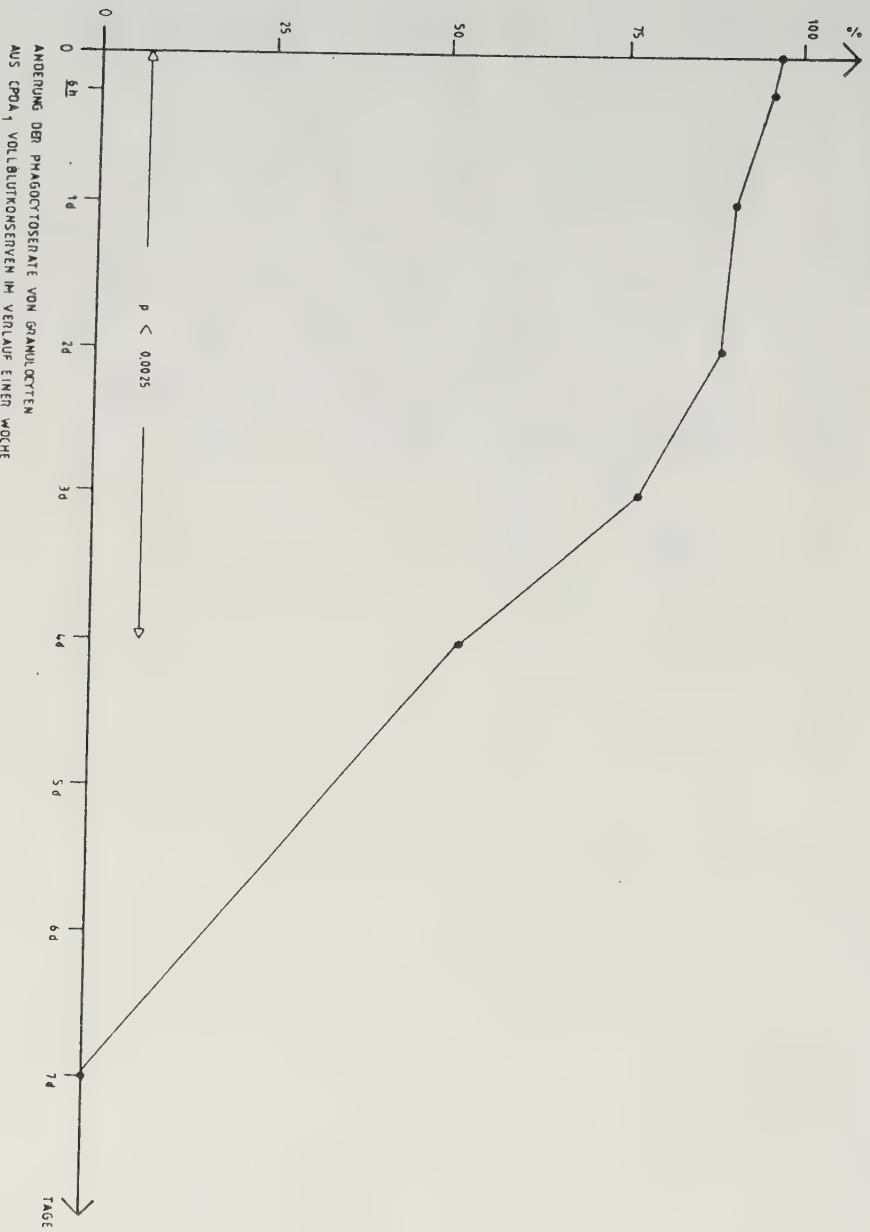


ABBILDUNG 7

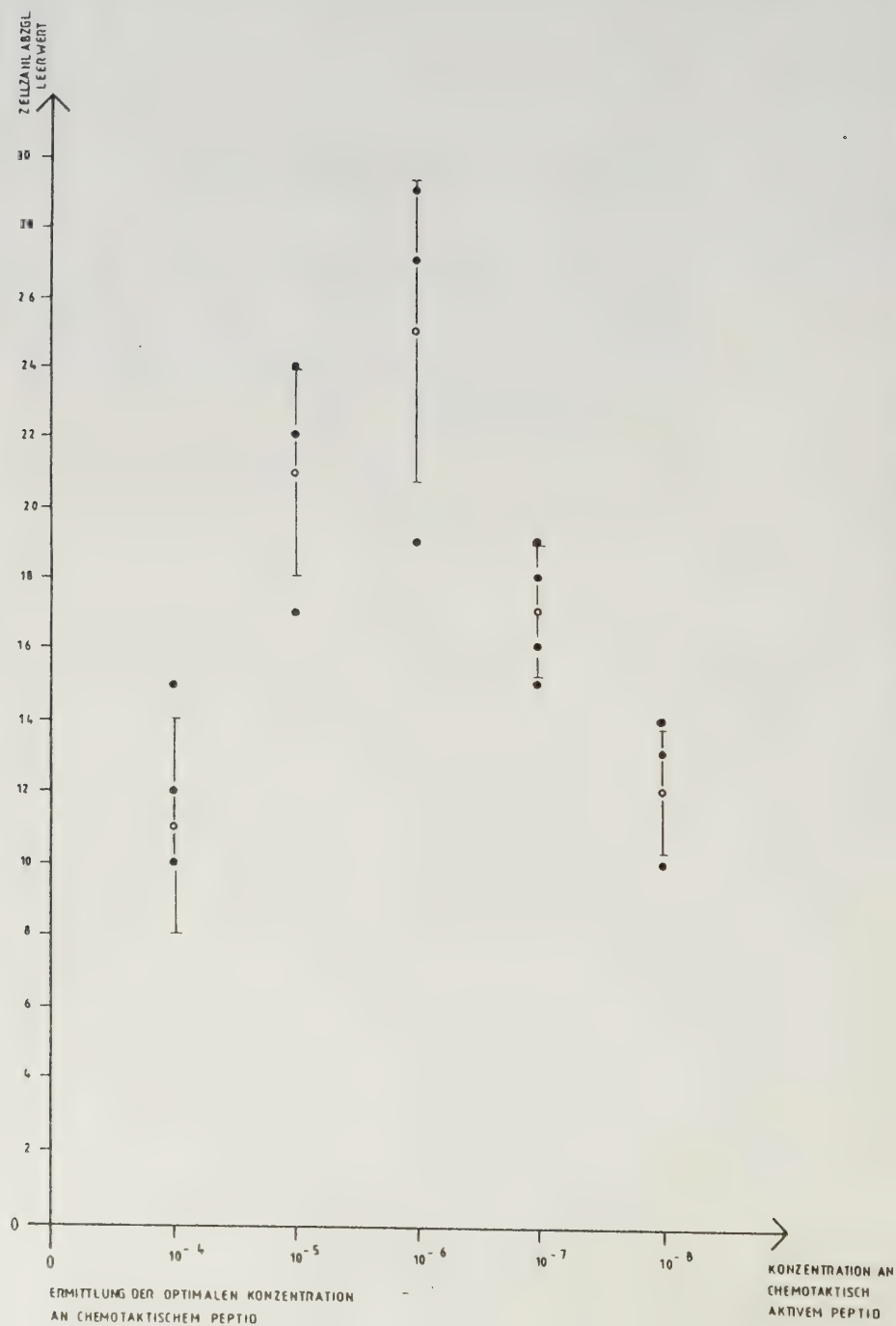
4.3. Chemotaxis

4.3.1. Ermittlung der optimal chemotaktisch wirksamen Peptidkonzentration von F-Meth-Leu-Phen-Phen

Der unter 3.3 beschriebene Test wurde mit einer absteigenden Konzentrationsreihe von 10^{-4} bis 10^{-8} molar durchgeführt (Abb. 8). Unter 10^{-6} molarer Verdünnung wanderten durchschnittlich 28 Granulocyten pro Gesichtsfeld bei 40 facher mikroskopischer Vergrößerung (Leerwert mit HBSS 3 Zellen/Gesichtsfeld), während die 10^{-5} molare Lösung im Mittel 24 Zellen und die 10^{-7} molare Lösung 20 Zellen ergab (Tab.4). Daher wurde für alle weiteren Versuche die 10^{-6} molare Peptidlösung benutzt.

Tabelle 4:

Konzentration an chemotaktischem Peptid	pro Gesichtsfeld ausgezählte Zellen	x	x-L	s
(HBSS-Leerwert)	2/3/3/2	3		
10^{-4}	13/15/11/18	14	11	2,9
10^{-5}	27/20/24/25	24	21	2,94
10^{-6}	32/28/30/22	28	25	4,3
10^{-7}	22/19/21/18	20	17	1,82
10^{-8}	15/16/17/13	15	12	1,7

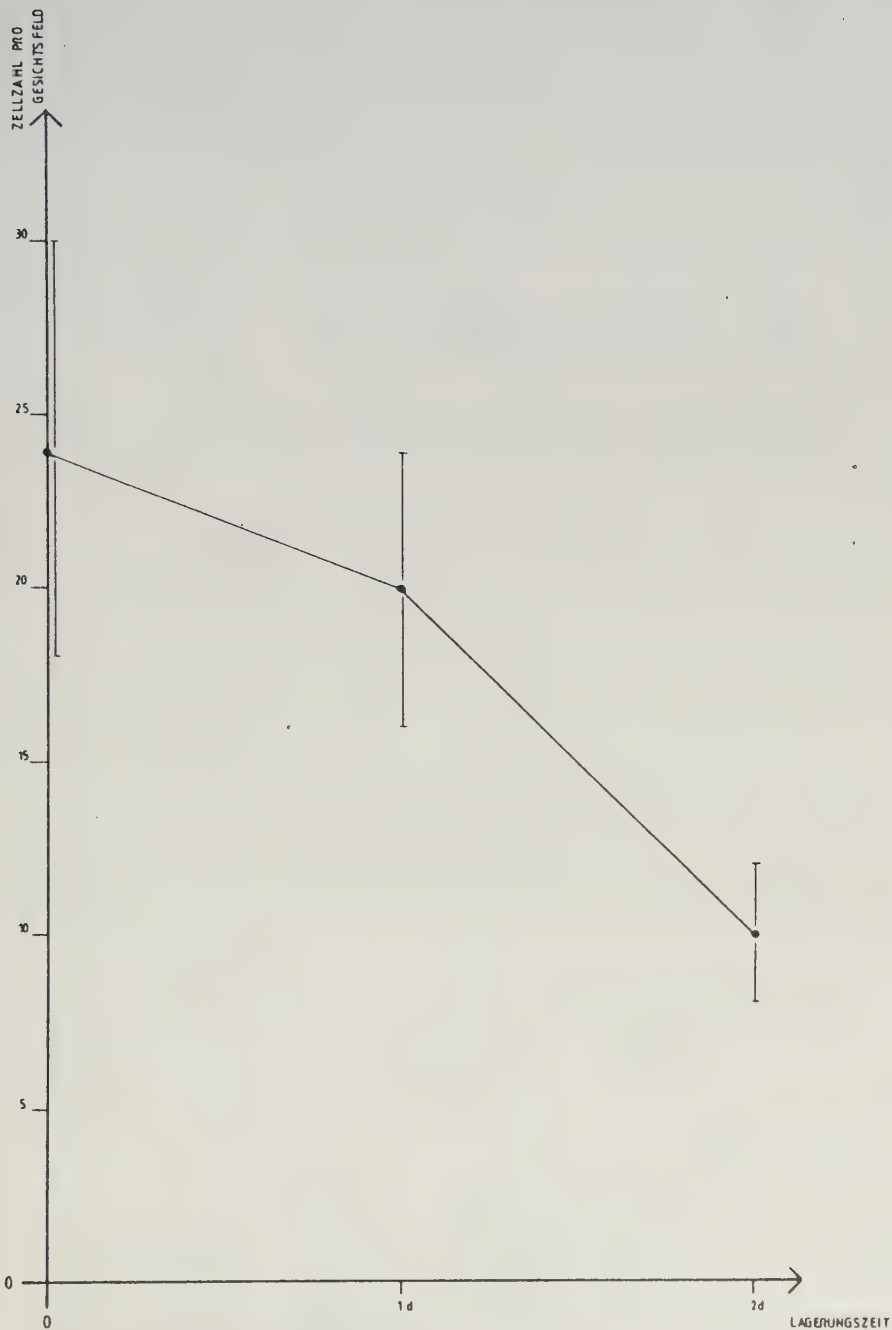


4.3.2. Chemotaktische Funktionstüchtigkeit von Granulocyten in CPDA₁ Vollblutkonserven

8 Konserven wurden sofort nach Fertigstellung und jeweils 1 und 2 Tage danach auf die Chemotaxisfähigkeit ihrer Granulocyten untersucht. Über durchschnittlich 24 Granulocyten pro Gesichtsfeld (Leerwert 6 Zellen) am Tag 0 und 20 Granulocyten pro Gesichtsfeld (Lw.6 Z.) einen Tag danach fiel die Zellzahl am Tag 2 bis auf 10 Zellen pro Gesichtsfeld (Lw.5 Z.) ab (Abb. 9; Tab.5). Bildet man dann den Quotienten aus dem Mittelwert der Zellzahl pro Gesichtsfeld und dem Mittelwert des jeweiligen Leerwerts, so zeigt sich auch hier ein kontinuierlicher Abfall von $4,6 \pm 1,6$ über $4,2 \pm 1,3$ auf $2,2 \pm 0,6$ (Tab.6). Abbildung 10 und 11 zeigen die über einen Tag gleichbleibende Wanderungseigenschaft und den deutlichen Abfall am 2. Tag.

Tabelle 5:

<u>Frischblut</u>		pro Gesichtsfeld ausgezählte Zellen		
Konserve	Leerwert Einzelwerte	x	Probe Einzelwerte	x
1	4/4/3	4	17/23/21/19/20/19	20
2	3/4/3	3	20/23/21/18/17/19	20
3	7/10/13	10	17/27/19/25/24/25	23
4	8/7/8	8	23/25/26/28/31/29	27
5	7/3/6	5	21/18/21/15/19/20	19
6	2/5/4	4	23/22/24/34/27/24	26
7	8/7/5	7	17/26/25/19/20/18	21
8	3/8/7	6	31/42/36/43/40/32	37
		--		--
		x=6		x=24
				s=6
<u>1d alte Konserven</u>				
Konserve	Leerwert Einzelwerte	x	Probe Einzelwerte	x
1	4/2/4	3	20/19/16/28/20/21	21
2	3/3/2	3	21/25/15/20/23/20	21
3	5/3/3	4	22/16/26/19/27/22	22
4	3/5/5	5	21/20/21/23/19/21	21
5	8/6/7	7	23/19/22/16/19/24	20
6	5/7/5	6	16/15/14/18/13/14	15
7	5/5/4	5	15/14/17/;7/16/19	16
8	13/12/10	12	30/25/27/27/26/24	27
		--		--
		x=6		x=20
				s=4
<u>2d alte Konserven</u>				
Konserve	Leerwert Einzelwerte	x	Probe Einzelwerte	x
1	4/2/6	4	5/8/11/10/9/10	9
2	5/4/2	4	5/10/11/6/7/9	10
3	5/5/5	5	8/8/7/8/7/9	8
4	3/4/5	4	10/16/10/10/12/12	12
5	9/11/11	10	14/10/11/10/13/12	12
6	1/3/4	3	12/10/14/10/8/11	11
7	3/2/3	3	10/9/10/11/10/9	10
8	6/7/7	7	10/15/11/13/12/10	12
		--		--
		x=5		x=10
				s=2



VERLAUF DER CHEMOTAKTISCHEN FUNKTION
VON GRANULOCYTEN IN CPDA, VOLLBLUTKONSERVEN

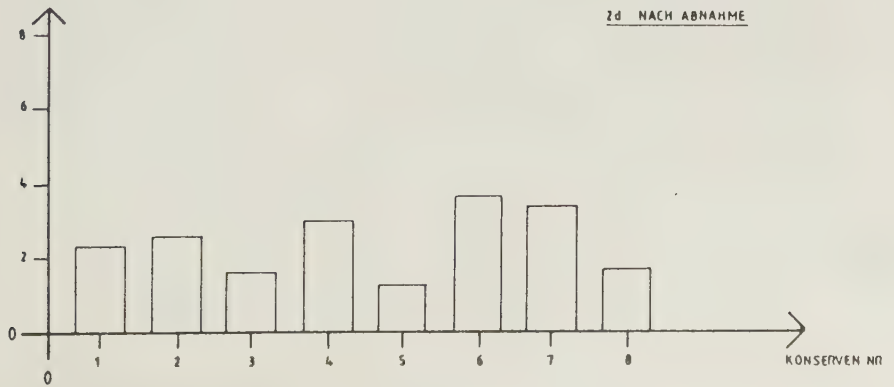
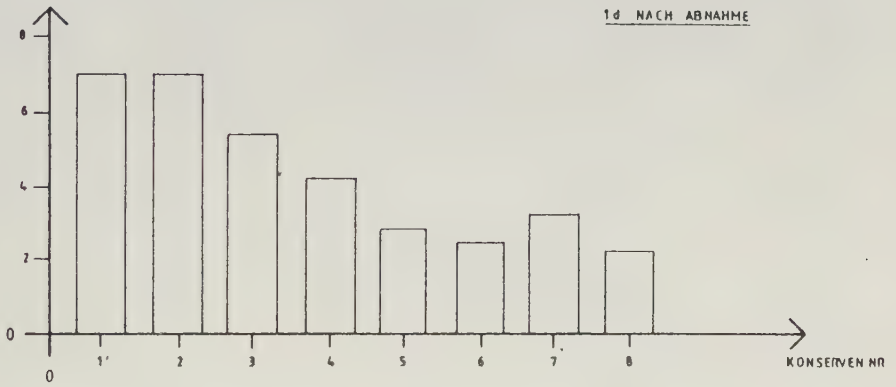
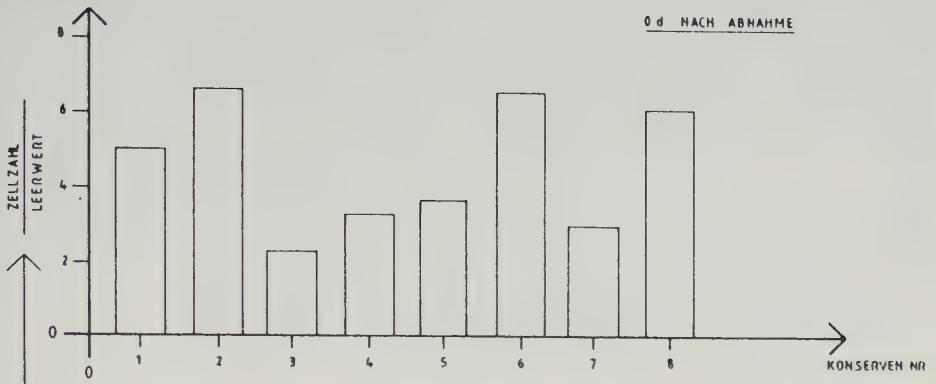
ABBILDUNG 9

Tabelle 6:

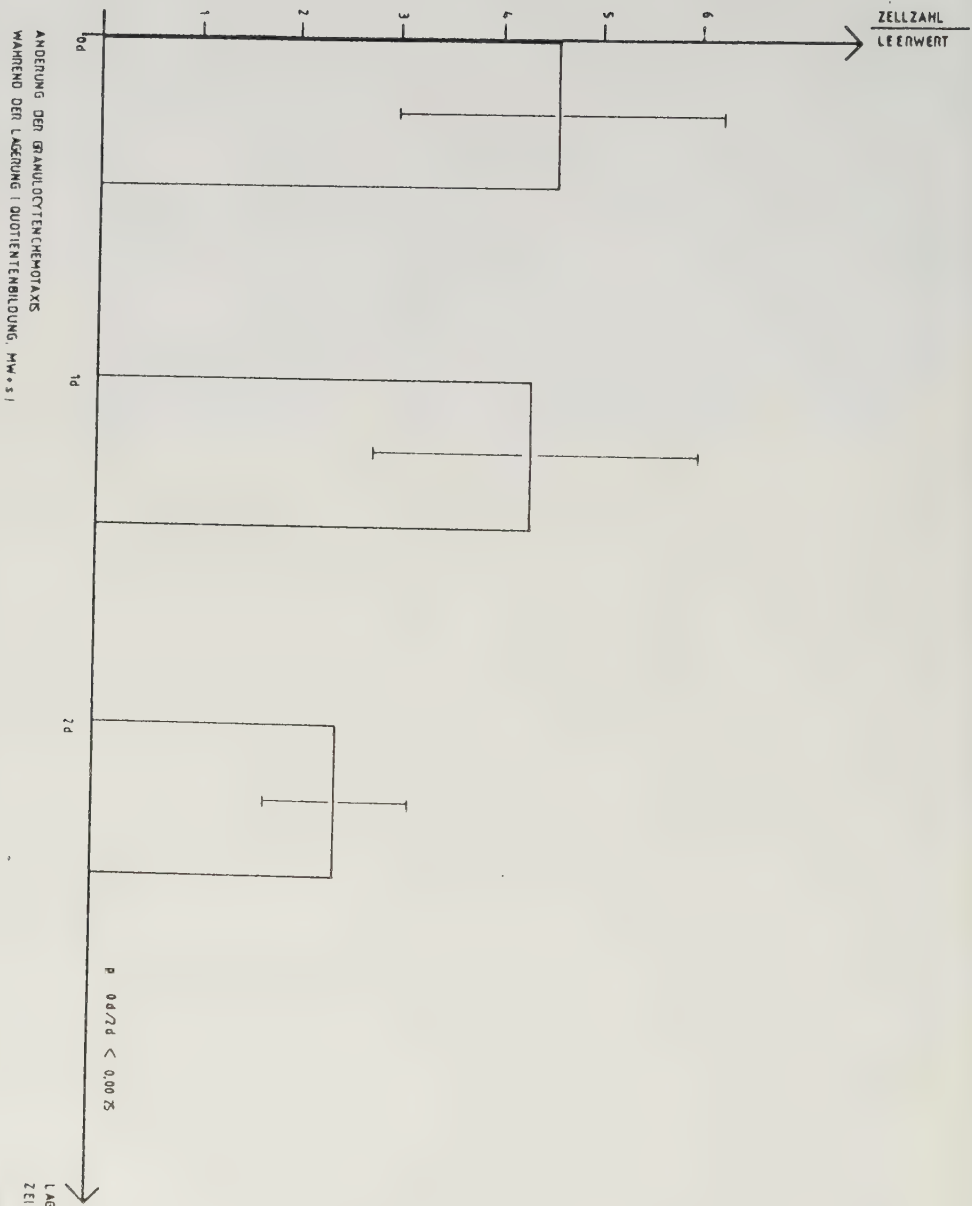
Chemotaxis

Quotient $\frac{\text{Mittelwert Einzelkonserve}}{\text{Mittelwert Leerwert}}$

Konservenalter	0d	1d	2d
Konservennummer			
1	5	7	2,25
2	6,7	7	2,5
3	2,3	5,5	1,6
4	3,4	4,2	3
5	3,8	2,9	1,2
6	6,5	2,5	3,7
7	3	3,2	3,33
8	6,16	2,25	1,7
	----	----	----
	x = 4,6	x = 4,3	x = 2,4
	s = 1,6	s = 1,6	s = 0,7



CHEMOTAXIS - QUOTIENTENBILDUNG
 AUS $\frac{\text{GEWANDERTEN ZELLEN}}{\text{LEERWERT}}$



4.4 Konzentration von C_{3a}/C_{5a} des Arginin in CPDA₁ Vollblutkonserven

4.4.1 C_{3a} -des Arg. Bestimmung

Aus 109 einzelnen Piloten von CPDA₁ Vollblutkonserven, die sofort nach Lieferung oder Herstellung im Transfusionszentrum bis nach 15 tägiger Lagerung zur Bestimmung verwandt wurden, wurde für jeden Tag die Konzentration von C_{3a} des Arginin ermittelt (Methode 3.4.).

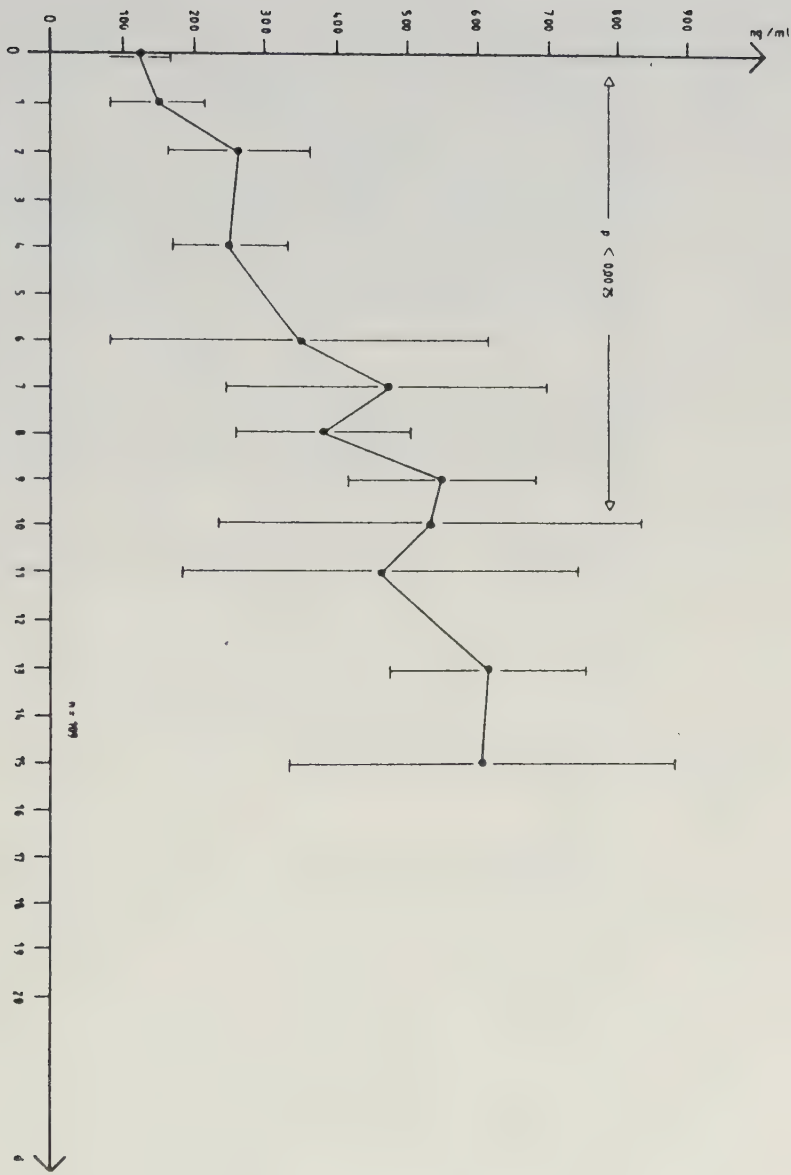
Bereits nach 10 Tagen fand sich ein hochsignifikanter Anstieg von C_{3a} des Arginin von 125 ± 42 ng/ml (Tag 0) auf 543 ± 299 ng/ml (Tag 10). Nach 15 Tagen wurden 609 ± 277 ng/ml gemessen. Zum 10 Tage-Wert kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 12 + Tab. 7).

Tabelle 7:

Bestimmung des C_{3a} des Arginin Spiegels
im CPDA₁ Vollblut

Konserven- alter	Einzelwerte in ng/ml	$\bar{x}$ ng/ml	s
0d	223/160/140/124/156 92/124/136/76/76/92/88	125	45,0
6h	264/88/160/200/264/200 200/72/60/100/140	155	75,6
1d	116/80/96/168/240/124/ 132/88/108/304/224/132	151	69,7
2d	112/200/192/400/472/312/ 164/232	261	124
4d	384/272/280/144/180	252	94
6d	264/216/152/328/1000/176/320	351	294
7d	720/720/560/424/124/232/208	426	247
8d	192/320/456/520/320/560/280	378	135
9d	360/520/740/640/640	580	145,5
10d	800/640/1000/1000/440/208 448/200/168	534	315
11d	184/184/480/480/960	458	317
12d	280/256/304/304/420/560	354	115
13d	604/336/720/880/540	616	202
14d	960/280/368/296	476	325
15d	1040/920/460/472/248/512	609	304

KONZENTRATIONSVORLAUF VON (3a - desane IN CPDA₁ - VOLLBLUT -
KONSENEN IM ABHÄNGIGKEIT VON DER LIEGENSDAUER (MIN ± 0)



4.4.2. C_{5a} -des Arg. Bestimmung

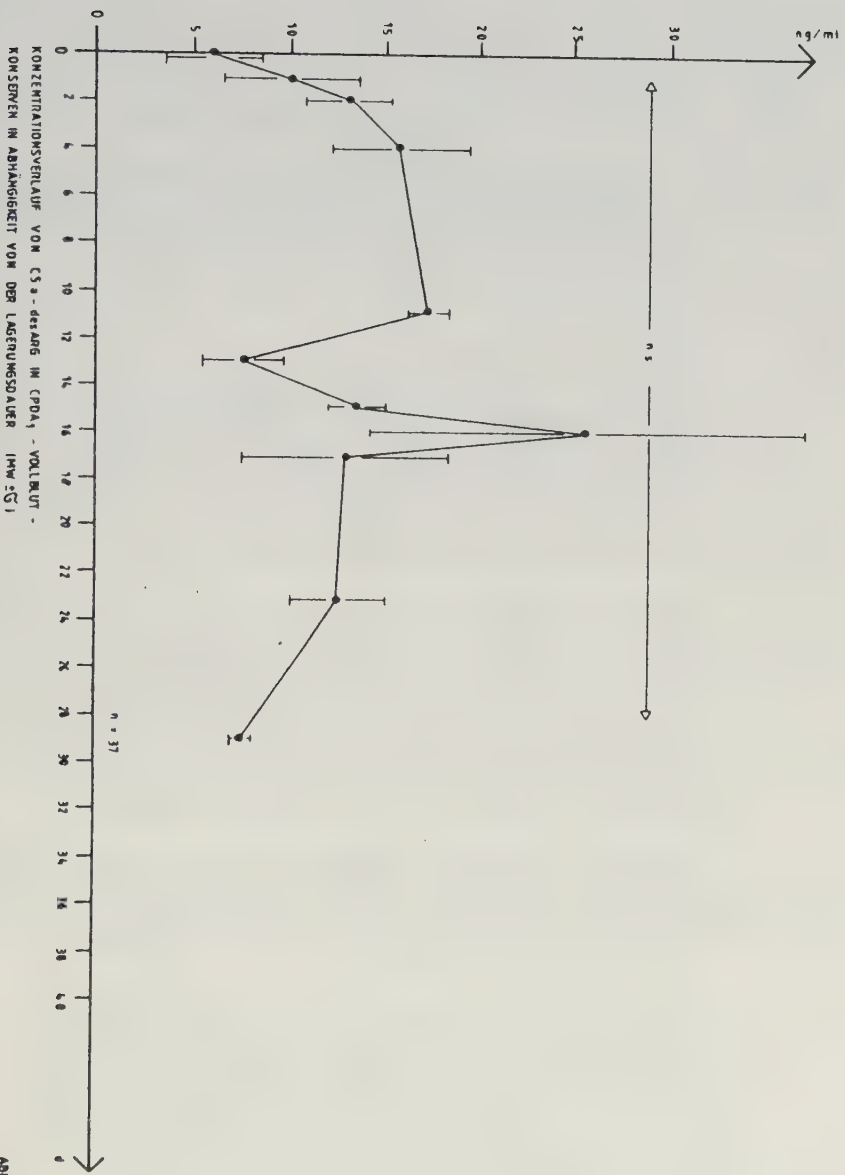
In 37 Piloten von CPDA₁ Vollblutkonserven wurde über 4 Wochen diskontinuierlich (0d, 1d, 2d, 4d, 11d, 13d, 15d, 16d, 17, 23d, 29d) der Verlauf der C_{5a} -des Arginin Konzentration verfolgt. Von einem Ausgangswert von $6 \pm 2,5$ ng/ml stieg die Konzentration zwar über $17,2 \pm 0,9$ ng/ml (Tag 11) auf $25,8 \pm 11,6$ ng/ml (Tag 16) an.

Die 17 Tage-Werte ergaben einen Mittelwert von $13 \pm 5,5$ ng/ml und am Tag 23 bzw. 29 wurden im Durchschnitt nur noch $12,4 \pm 2,4$ ng/ml bzw. $7,4$ ng/ml gemessen.

Tabelle 8 und Abbildung 13 zeigen keinen signifikanten Anstieg von C_{5a} -des Arginin in der Konserve über einen 29 tägigen Lagerungszeitraum.

Tabelle 8:
Bestimmung des C_{5a} des Arginin Spiegels
im CPDA₁ Vollblut

Konserven- alter	Einzelwerte in ng/ml	$\bar{x}$ ng/ml	s
0d	6/4/10/4	6	2,82
1d	7,6/6,8/10/4/14/12/13,2	9,7	3,68
2d	14/10/15	13	2,6
4d	20/16/11,2	15,7	4,4
11d	16/17,6/18	17,2	1,05
13d	5,6/9,6	7,6	2,82
15d	25,6/5,2/27,2/13,2/5,6	15,4	10,5
16d	9,6/36/32	25,8	14,2
17d	10,4/20,8/8	13	6,8
23d	14/10,8	12,4	2,26
29d	7,2/7,6	7,4	0,28



4.5. Konzentration von Elastase in der CPDA₁ Konserve

Am Tag 0,1,3,5,7 nach Herstellung der Konserve wurde in 5 Konserven die Konzentration von Elastase mittels der unter 3.5 beschriebenen Methode untersucht. Die spontane Elastasefreisetzung aus Granulocyten wurde mit Endotoxin stimulierter (25 ug/ml bzw. 50 ug/ml) verglichen.

Von einem Mittelwert von 224 ± 36 ng/ml am Tag 0 stieg die Konzentration der Elastase (ohne Stimulierung) auf 1470 ± 373 ng/ml am Tag 7 an. Es erfolgte also ein spontaner Anstieg um das 7 fache des Ausgangswerts. Bei Endotoxinstimulation fanden sich ein Ausgangswert von $1047 \pm$ ng/ml bei 25 ug/ml Endotoxin und 1332 ± 551 ng/ml bei 50 ug/ml (vgl.Tab. 9).

Da sich im Zeitraum von 7 Tagen niemals ein signifikanter Unterschied zwischen den Elastasekonzentrationen, die durch 25 ug/ml bzw. 50 ug/ml Endotoxin freigesetzt wurden, fand, wurde bei den weiteren Versuchen nur noch unter 25 ug/ml Endotoxin die Freisetzung von Elastase, Myeloperoxidase und Laktoferrin gemessen.

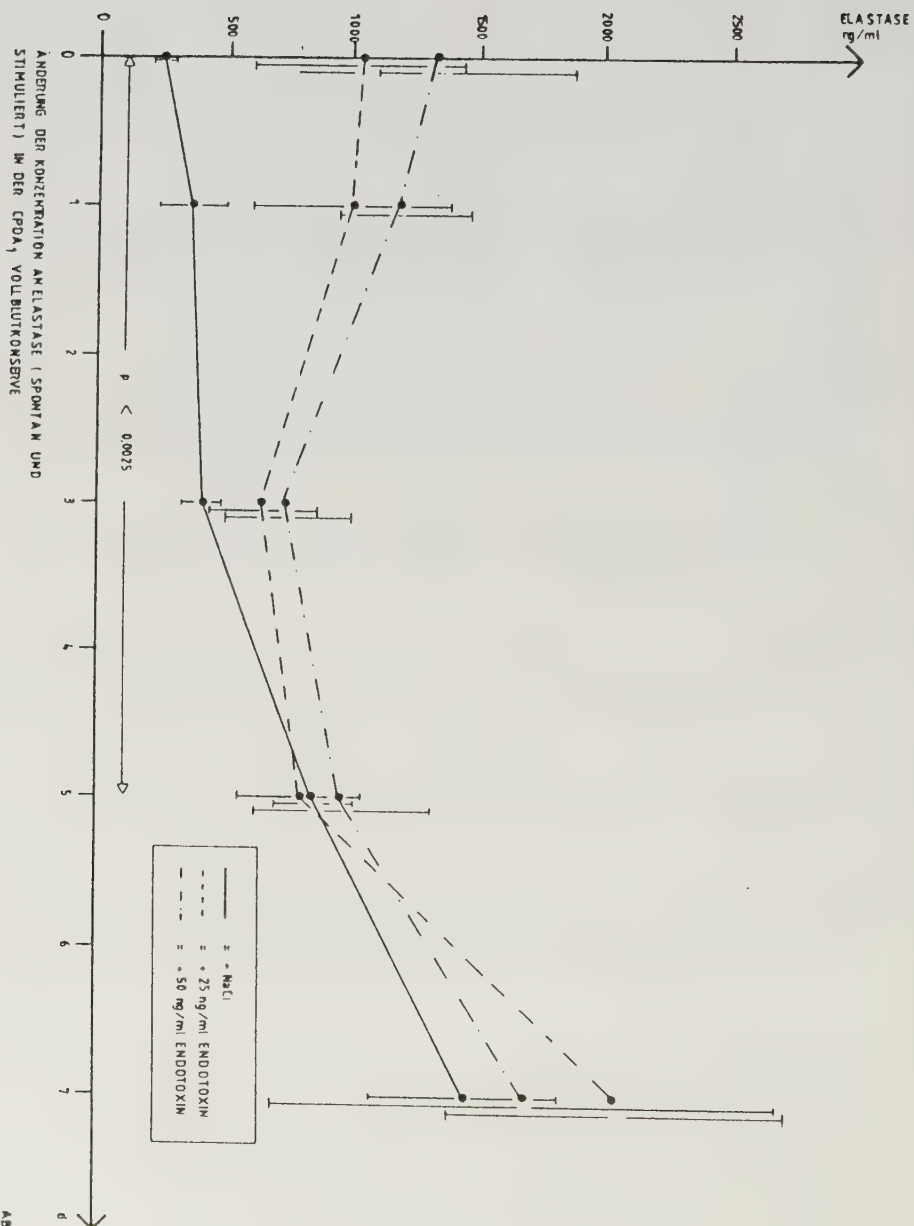
Bei der durch Endotoxin freigesetzten Elastase kam es nach initialem Abfall - über 646 ± 222 ug/ml am Tag 3 und 822 ± 156 ug/ml am Tag 5 wieder zu einem Anstieg auf 2084 ± 996 ug/ml am Tag 7.

Die Differenz aber zwischen der Elastasekonzentration ohne und mit Endotoxinstimulierung verringerte sich stetig bis zum 5. Tag. Nach der gesamten Lagerungszeit unterschieden sich beide Werte nicht mehr signifikant. Abbildung 14 zeigt den Verlauf der Konzentrationsänderung, während Abbildung 15 die Differenz aus den Elastasekonzentrationen mit und ohne Endotoxinzusatz darstellt.

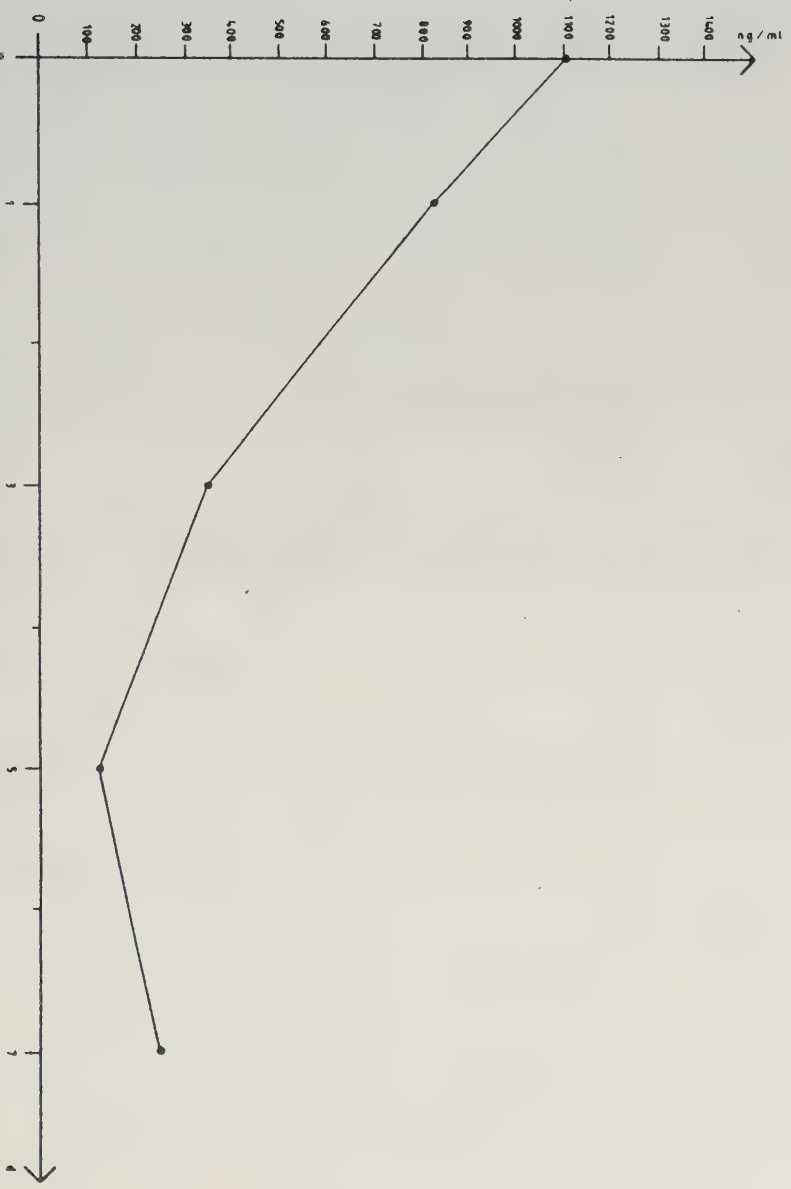
Tabelle 9:

Konzentration an Elastase in CPDA₁ Vollblutkonserven in ng/ml

		Konserve						
		1	2	3	4	5	x	s
Tag 0	+ NaCl	279	182	218	210	233	224	36
	+ 25ug/ml Endotoxin	1027	1401	452	1436	920	1047	402
	+ 50ug/ml Endotoxin	928	1701	652	1962	1448	1332	551
Tag 1	+ NaCl	468	268	203	509	415	372	132
	+ 25ug/ml Endotoxin	882	1276	512	1536	879	1017	396
	+ 50ug/ml Endotoxin	1229	1394	769	1399	1125	1197	264
Tag 3	+ NaCl	292	480	412	449	421	411	72
	+ 25ug/ml Endotoxin	945	639	347	745	556	646	222
	+ 50ug/ml Endotoxin	540	743	1198	705	595	756	260
Tag 5	+ NaCl	1058	912	525	1084	681	852	243
	+ 25ug/ml Endotoxin	996	638	680	871	923	822	156
	+ 50ug/ml Endotoxin	1344	1268	462	905	884	973	353
Tag 7	+ NaCl	1865	1413	1218	1833	1021	1470	373
	+ 25ug/ml Endotoxin	3655	1715	934	2079	1858	2048	996
	+ 50ug/ml Endotoxin	2702	1331	1378	2077	1094	1716	662



VERLAUF DER ELASTASEKONZENTRATION IM CPD₁ - VOLBLUTKONSERVUM
 OFFENFÜRZ DER MIT ENDOTOXIN (50 mg/ml) STIMULIERTEN KONZENTRATION
 VON DER SPONTANEN KONZENTRATION



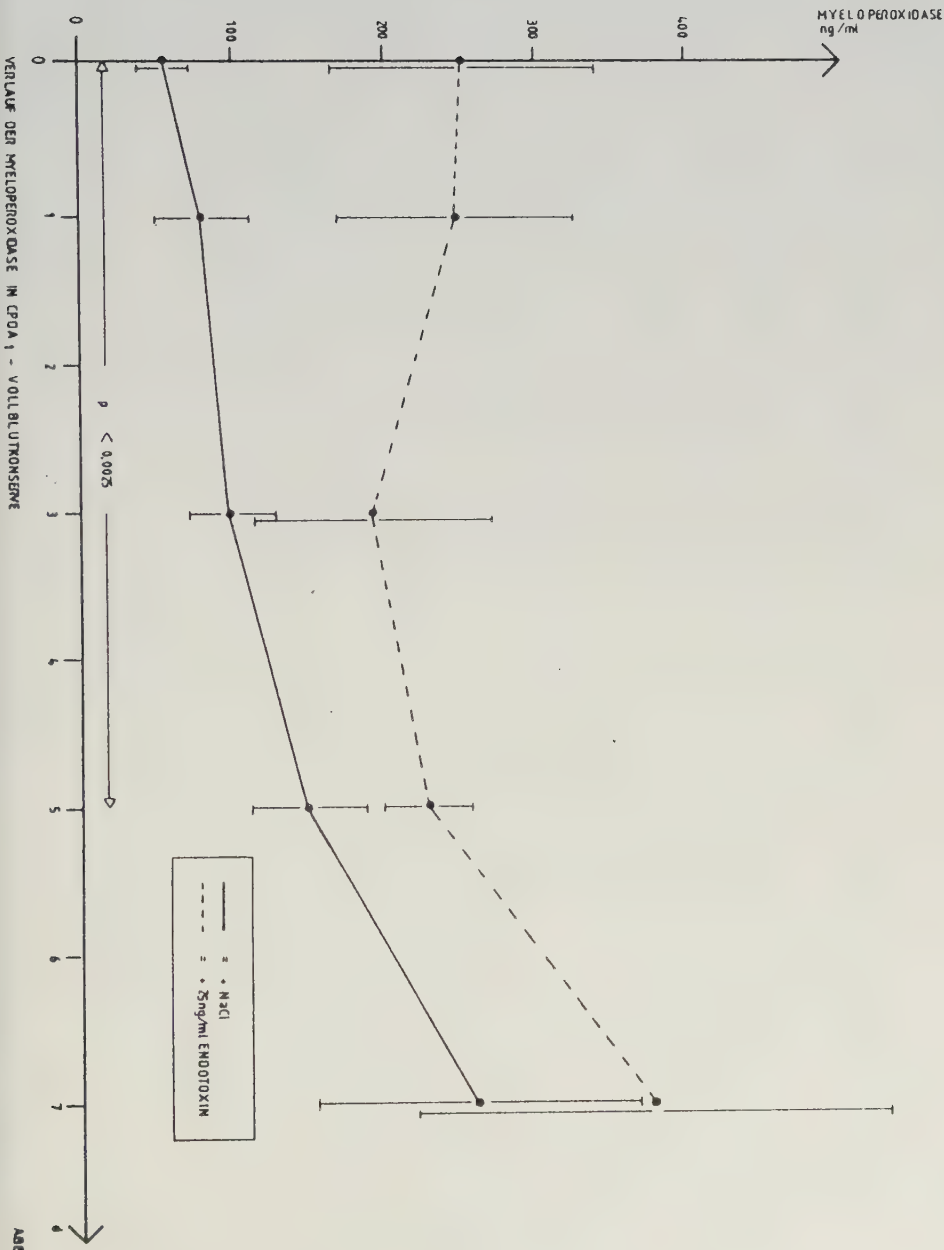
4.6. Konzentration an Myeloperoxidase in CPDA₁ Konserven

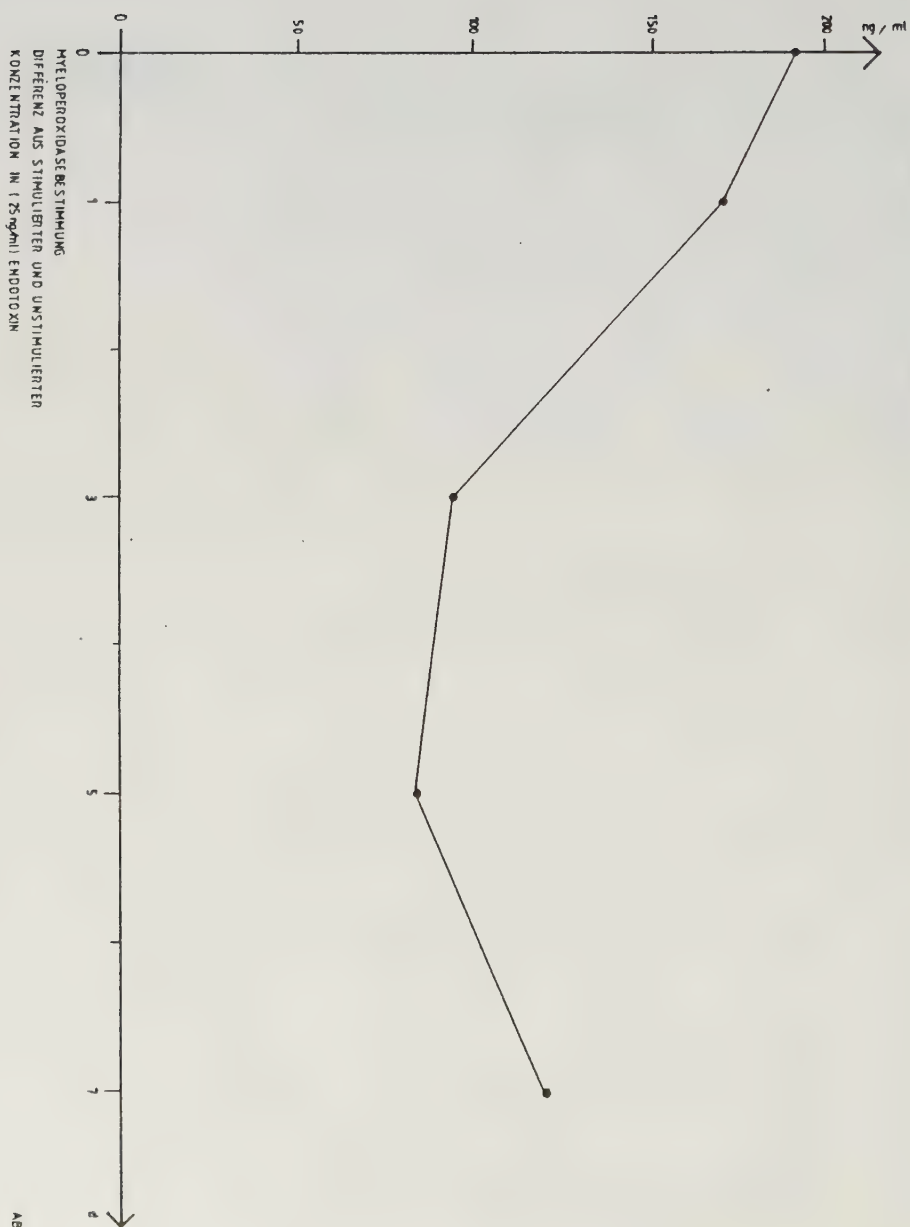
Im gleichen Versuchsaufbau wie unter 4.5 wurde die Konzentration von Myeloperoxidase bestimmt. Auch hier zeigte sich ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg von 56 ng/ml auf 258 ng/ml. Unter Zusatz von 25 ug/ml Endotoxin veränderte sich die Konzentration der Myeloperoxidase über einen Zeitraum von 5 Tagen nicht signifikant; sie schwankte immer um den Ausgangswert von 250 ± 86 ng/ml. Erst am Tag 7 wird hier ein signifikanter Anstieg auf 377 ± 156 ng/ml deutlich (Abbildung 16 und Tabelle 10). Abbildung 17 zeigt die Differenz aus stimulierter und spontaner Enzymkonzentration.

Tabelle 10:

Konzentration an Myeloperoxidase
in CPDA₁ Vollblutkonserven in ng/ml

		Konserven					x	s
		1	2	3	4	5		
Tag 0	+ NaCl	83	51	54	48	43	56	16
	+ 25ug/ml Endotoxin	315	326	145	295	170	250	86
Tag 1	+ NaCl	122	69	44	93	62	78	30
	+ 25ug/ml Endotoxin	297	290	136	315	200	248	77
Tag 3	+ NaCl	84	136	89	115	69	99	27
	+ 25ug/ml Endotoxin	313	205	106	193	142	192	79
Tag 5	+ NaCl	185	158	108	175	108	147	37
	+ 25ug/ml Endotoxin	264	219	232	243	185	229	29
Tag 7	+ NaCl	409	244	193	308	136	258	106
	+ 25ug/ml Endotoxin	639	325	258	394	270	377	156





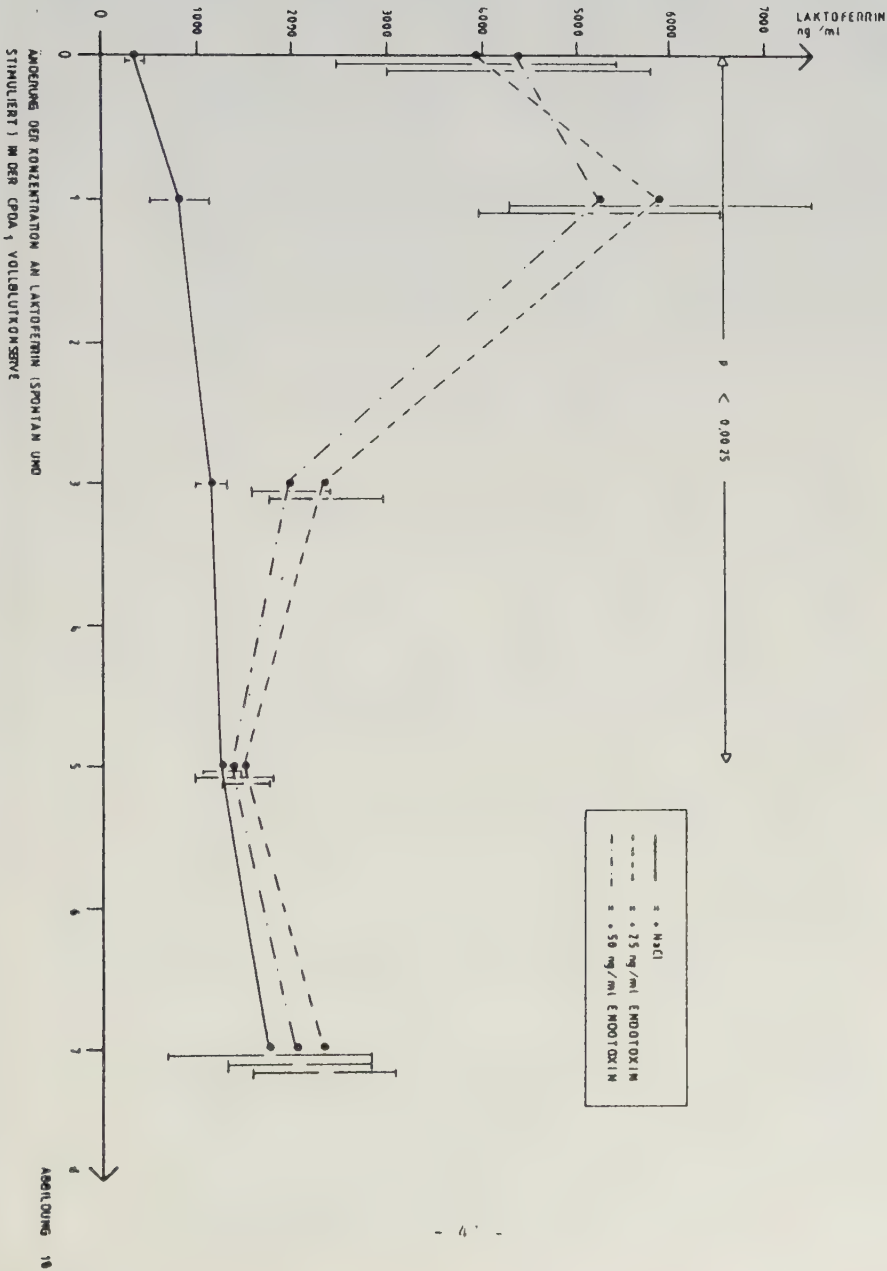
4.7. Konzentration an Laktoferrin in CPDA₁ Konserven

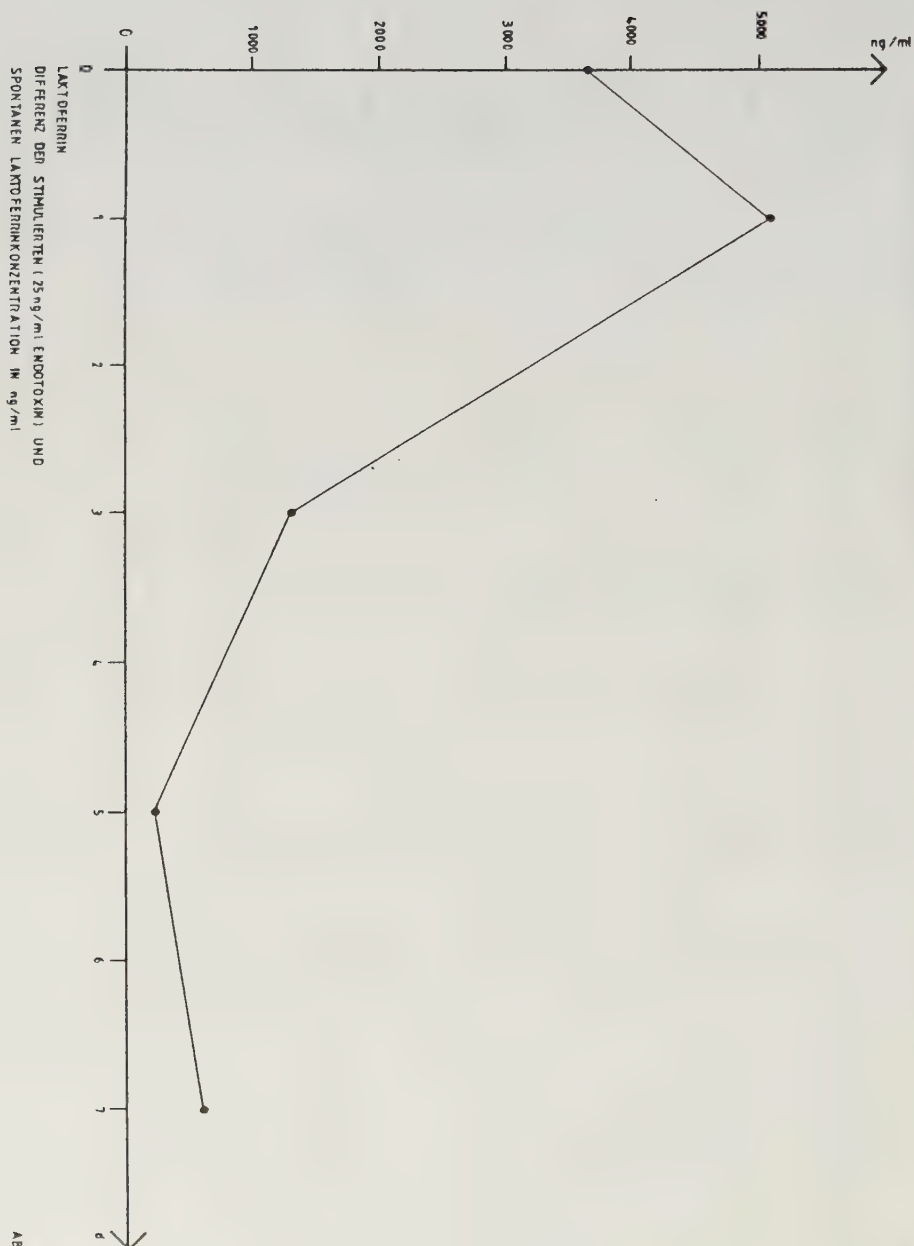
Dieselben Blutproben wie unter 4.5 wurden mit und ohne Endotoxinstimulierung auf ihren Laktoferringehalt untersucht. Die Laktoferrinkonzentration betrug am Abnahmetag 347 ± 95 ng/ml und stieg stetig bis auf 1718 ± 664 ng/ml am 7. Tag an. Nach Zusatz von 25 ug/ml Endotoxin wurde am Tag 0 $3994 \pm$ ng/ml gemessen. Nach einem Tag stieg der Laktoferrinspiegel auf $5861 \pm$ ng/ml an. 3 Tage bzw. 5 Tage nach Herstellung der Konserve fielen die Werte in dieser Versuchsreihe auf 2307 ng/ml bzw. 1464 ng/ml ab. Bis zum 7. Tag stieg die Konzentration dann wieder auf 2332 ng/ml (Abb. 18) an. Die Differenz der Konzentration mit und ohne Endotoxinstimulation glich sich im Verlauf von 7 Tagen an (Abbildung 19 und Tabelle 11)

Tabelle 11:

Konzentration an Laktoferrin
in CPDA₁ Vollblutkonserven in ng/ml

		Konserve						
		1	2	3	4	5	x	s
Tag 0	+ NaCl	447	420	371	229	266	347	95
	+ 25ug/ml Endotoxin	3400	5067	2315	5997	3190	3994	1498
	+ 50ug/ml Endotoxin	4470	5789	2167	5368	3934	4346	1419
Tag 1	+ NaCl	1313	531	552	780	772	790	315
	+ 25ug/ml Endotoxin	6314	6881	3617	7632	4859	5861	1614
	+ 50ug/ml Endotoxin	5560	6596	3180	5223	5672	5245	1262
Tag 3	+ NaCl	1264	1205	962	1190	922	1109	155
	+ 25ug/ml Endotoxin	2442	3170	1661	2489	1772	2307	612
	+ 50ug/ml Endotoxin	1750	2572	2244	1742	1689	1999	391
Tag 5	+ NaCl	1230	1468	1173	1348	867	1217	226
	+ 25ug/ml Endotoxin	1822	1621	1419	1259	1198	1464	259
	+ 50ug/ml Endotoxin	2016	1761	952	1314	1155	1440	439
Tag 7	+ NaCl	3620	1484	1224	2068	1192	1718	1074
	+ 25ug/ml Endotoxin	3625	2006	1735	2057	2237	2332	745
	+ 50ug/ml Endotoxin	3023	1775	1905	2180	1209	2018	664





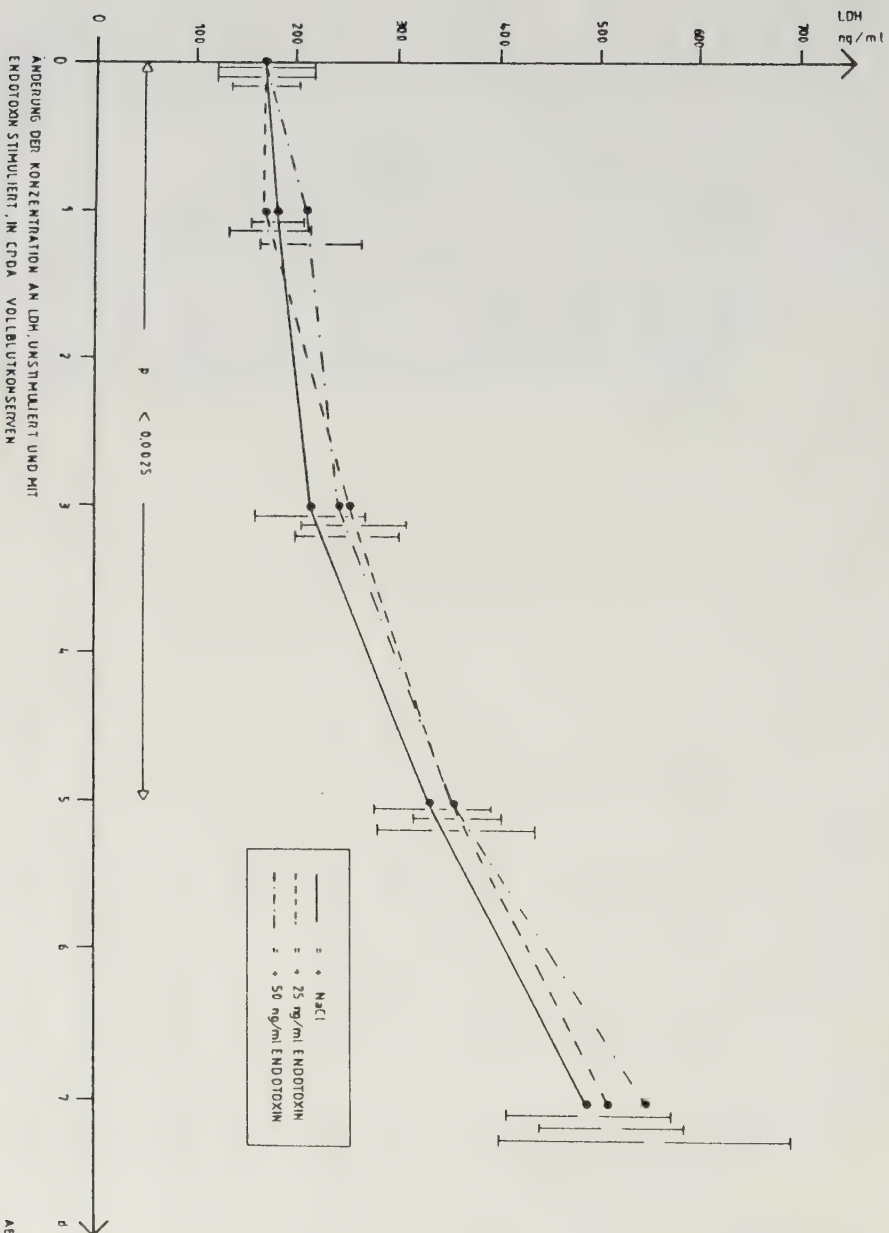
4.8 Konzentration von LDH in CPDA₁ Konserven

Über den Zeitraum von 7 Tagen wurde in fünf Konserven der LDH - Serumenzym Spiegel bestimmt. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg von 169 U/ml auf 485 U/ml. Durch Zusatz von 25 g/ml bzw. 50 g/ml Endotoxin konnte kein signifikanter Unterschied des Serumenzym Spiegels gefunden werden (Abbildung 20 und Tabelle 12).

Tabelle 12:

Konzentration an LDH
in CPDA₁ Vollblutkonserven in U/ml

		Konserve						
		1	2	3	4	5	x	s
Tag 0	+ NaCl	169	220	195	165	90	168	49
	+ 25ug/ml Endotoxin	180	244	175	145	109	171	50
	+ 50ug/ml Endotoxin	205	205	154	160	130	171	33
Tag 1	+ NaCl	205	202	169	175	139	178	27
	+ 25ug/ml Endotoxin	195	220	175	145	120	171	40
	+ 50ug/ml Endotoxin	270	250	180	175	154	206	51
Tag 3	+ NaCl	255	259	214	225	120	215	56
	+ 25ug/ml Endotoxin	330	285	225	210	205	251	54
	+ 50ug/ml Endotoxin	274	244	300	225	165	242	51
Tag 5	+ NaCl	364	420	295	289	295	333	58
	+ 25ug/ml Endotoxin	405	364	400	319	310	360	44
	+ 50ug/ml Endotoxin	484	375	285	334	310	358	78
Tag 7	+ NaCl	615	405	435	495	475	485	81
	+ 25ug/ml Endotoxin	625	514	454	480	460	507	70
	+ 50ug/ml Endotoxin	705	615	615	450	340	545	147



5. Diskussion

5.1 Wahl des Antikoagulans für die Blutkonserve

ACD (Acid-Citrat-Dextrose) und CPD (Citrat-Phosphat-Dextrose) sind die zur Zeit bevorzugten Antikoagulantien in der Transfusionsmedizin. Beide Blutstabilisatoren wirken über die Bindung von Calcium in seiner ionisierten Form, wodurch die Gerinnungsfähigkeit des Blutes aufgehoben wird.

CPD - Vollblut unterscheidet sich vom ACD -Vollblut durch einen niedrigeren Gehalt an Citronensäure (8g bzw. 3g), was hauptsächlich zur Konzentrationssteigerung von 2,3 DPG in der Konserve führt (32). Hierdurch wird die Sauerstoffaffinität der Erythrocyten erniedrigt.

In unseren Untersuchungen verwendeten wir ausschließlich CPDA₁ Beutel. Denn durch den Zusatz von Adenin soll die Konzentration von ATP in der Konserve langsamer absinken. Es ist beschrieben, daß hierdurch die Lagerungsfähigkeit der Erythrozyten in der Konserve von 35 auf 42 Tage verlängert wird (32).

5.2 Funktion der Granulocyten in der CPDA₁ - Vollblutkonserve

5.2.1 Änderung der Konzentration der Leukocyten

Über den Zeitraum einer Woche wurde unter der Neubauer-kammer die Leukocyten pro ml ausgezählt. Die Ausgangswerte der Leukozyten in den CPDA₁-Vollblutkonserven bewegten sich zwischen 4850/ml und 7025/ml; d.h. alle Werte waren innerhalb des klinischen Normbereichs. Nach einer Woche Lagerung sanken die Leukozyten auf Werte zwischen 3650 - 4825 /ml ab.

Somit lag die absolute Zahl der Leukozyten an der unteren Grenze des Normbereichs, wobei aber der Prozentsatz geschädigter Zellen nicht berücksichtigt wurde.

Der bei uns ermittelte Abfall der Leukocytenzahl um ca. 30% innerhalb einer Woche liegt im selben Bereich, wie er von anderen Autoren bestimmt wurde (2,12,28).

In Mc. Culloughs 1969 durchgeführten Untersuchungen in ACD - Konserven stellte sich nach 7 Tagen ein kontinuierlicher Abfall der Leukocytenzahl von durchschnittlich 5700/ml auf 4500/ml ein (12). Dabei fand er nach einer Woche Lagerung 45% an Leukozyten mit leichten bis mittelgradigen zellulären Veränderungen; d.h. Vakuolenbildung, Degranulierung, Hyperchromasie des Zellkerns, Verlust an Chromatinstrukturen. Bei 13.7% der Leukozyten zeigten sich hierbei schwere Zellschäden; d.h. diese Zellen konnten nicht mehr differenziert werden. Der selbe Autor verglich 1973 in mit CPD, ACD, Heparin und Ionenaustauschern antikoagulierten Konserven den leukocyten Konzentrationen abfall (15). Wiederum im Zeitraum von 7 Tagen ergab sich in ACD, CPD und Heparin - Konserven ein 20%iger Abfall der Leukocytenzahl pro ml, bei Ionenaustauschern von 40%.

Sowohl in ACD - als auch in CPD - Konserven waren 14% der Leukocyten nach einem Tag Lagerung als geschädigt identifiziert worden. In Heparin Konserven veränderten sich nur 6% der Zellen, während sich bei den Ionenaustauschern eine 27% Zunahme geschädigter Zellen fand. Nach 3 Tagen waren in CPD und ACD Konserven an 70% der Leukocyten morphologische Veränderungen aufgetreten; bei den beiden anderen Konservenarten stieg der Anteil geschädigter Zellen sogar auf 80% an.

An Hand dieser Untersuchung wird aber auch deutlich, daß sich ACD und CPD - Konserven nicht im Hinblick auf den leukocytären Abfall unterscheiden.

5.2.2 Phagocytose der Leukocyten

5.2.2.1 Problematik der Bestimmung der Phagocytose

Mehrere gleichwertige Verfahren zur Bestimmung der Phagocytosefähigkeit von Zellen in vitro sind in der Literatur beschrieben (7). Einerseits besteht die Möglichkeit licht- oder elektronenmikroskopisch die Aufnahme von Partikeln, wie opsoniertem Zymosan, zu untersuchen. Das elektronenmikroskopische Vorgehen ist zwar zeitaufwendiger, bringt aber den Vorteil, genau beurteilen zu können, ob das Partikel vollkommen phagocytliert wurde, und nicht nur an der Zelloberfläche haftet.

Andererseits wird die Phagocytose an Hand der Aufnahme von Bakterien wie *Staphylococcus aureus* oder *Eschericia coli* geprüft. Nach Inkubation von PMN (polymorph-nucleären) Granulocyten und Bakterien (meist im Verhältnis 1:1) über 1-2 Stunden wird das Ausmaß phagocytlierter Bakterien durch kulturelle Anzüchtung oder durch Meßung der Ingestion radioaktiv markierter Bakterien (^{14}C) bestimmt (7). Diese Tests können aber nur eine semiquantitative Aussage machen, sie liefern nur eine quantitative Annäherung.

Trotz routinemäßiger Anwendung des bakteriellen Tests bei granulocytären Erkrankungen müssen folgende Fehlerquellen berücksichtigt werden (6):

- Verklumpung der Bakterien; d.h. es bilden sich keine Einzelkolonien auf der Agarplatte nach meanderförmigen Verstreichen
Die Platten können dann nicht mehr korrekt ausgezählt werden

- Kontamination der Agarplatte durch Sekundärveränderung; z.B. Überwucherung der Kultur durch Pilze

- Abtötung der Bakterien durch Aufbringen auf zu heißen Nähragar

Kontamination der Bakteriensuspension durch Phagen;
dadurch wird bakterielles Wachstum eingeschränkt

Diese Fehlerquellen lassen sich jedoch weitgehend durch Verwendung von sorgfältig sterilisiertem Material und Anlegen von Mehrfachkulturen ausschließen.

5.2.2.2 Beeinflussung der Phagocytose

Verschiedene extrazelluläre wie bakterielle Faktoren können die Phagocytose der PMN - Leukocyten beeinflussen.

Petterson (41) beobachtete, daß verschiedene Bakterienstämme unterschiedlich schnell phagocytiert werden; Staphylococcus epidermidis schneller als Staphylococcus aureus, Staph. aureus Wood 46 besser als Staph. aureus 502A, wobei letzterer besser abgetötet wird. Die Phagocytoserate von Bakterien wird also von ihrer eigenen Virulenz beeinflusst.

Entscheidenden Einfluß auf die Phagocytose spielen sicherlich auch serogene Faktoren. In unseren Versuchen kam es zu keiner bakteriellen Phagocytose, wenn dem Bakterien -Granulocytenmisch kein Serum zugeführt wurde (vgl. Abb. 1). Im Serum sind hitzelabile Faktoren, unter anderem Faktoren des Komplementsystems, und hitzestabile Faktoren wie die Immunglobuline enthalten, die zur Opsonierung der Bakterien und somit zu einer effizienten Phagocytose notwendig sind.

Auch der Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Phagocytoserate wurde von Petterson aufgezeigt. Bei 41°C Inkubationstemperatur phagocytierten die Leukocyten deutlich abgeschwächt im Vergleich zu 37 °C (41).

5.2.2.3 Änderung der Phagocytosefähigkeit von PMN - Leukocyten in CPDA₁ - Vollblutkonserven während der Lagerung

Vor noch 10 - 20 Jahren wurde angenommen, daß die Phagocytosefähigkeit von PMN - Granulocyten über wenige Stunden bis zu 1 bis 2 Tagen erhalten bleibt. Die vorliegende Studie zeigt aber, daß nach 48 Stunden 88% der ursprünglichen Phagocytose im CPDA₁ Vollblut erhalten geblieben ist und daß nach 4 Tagen diese auf 52% abgesunken ist. Nach 7 Tagen findet keine Phagocytose mehr statt.

In Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Untersuchungen fand T.A.Lane 1978 bei Untersuchungen von Granulocytenkonzentraten heraus, daß nach 2tägiger Lagerung unter 6°C $74 \pm 5\%$ von E.coli Bakterien nach 90minütiger Inkubation phagocytiert waren. Unter 24°C Lagerungstemperatur waren die Zellen nach 48 Stunden nicht mehr zur Phagocytose fähig (30).

Auch Crowley konnte 1974 einen ähnlichen Abfall der Phagocytosefähigkeit der Granulocyten während der Lagerung bei 4°C im Verlauf einer Woche in ACD Plasma nachweisen.(11)

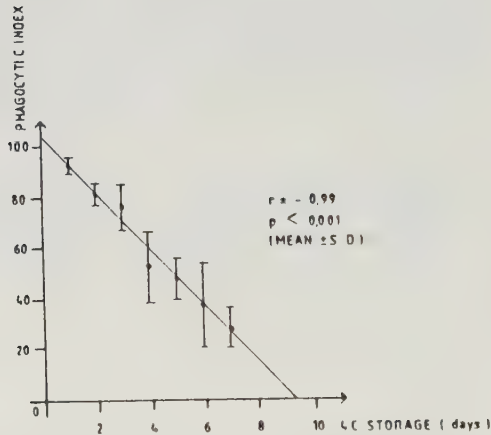


ABBILDUNG 21

Mc. Cullough verglich 1973 die Phagocytose von Bakterien in verschiedenen Antikoagulantien. ACD, CPD, Heparin, EDTA und Ionenaustauscher zeigten sofort nach Herstellung des Granulocytenkonzentrats 96% - 99%ige Aktivität. Nach 24 Stunden blieb die Phagocytosefähigkeit in allen Konserven konstant, außer bei EDTA Antikoagulation. In ACD und CPD Konserven zeigte sich 48 und 72 Stunden nach Lagerungsbeginn fast unveränderte Phagocytosefähigkeit, die erst nach 96 Stunden deutlich abnahm (12).

5.2.3 Chemotaxis der PMN - Granulocyten

5.2.3.1 Problematik der Bestimmung der Chemotaxis

Mehrere verschiedene Techniken der Bestimmung der Chemotaxis von PMN - Granulocyten wurden in den letzten beiden Jahrzehnten entwickelt (22).

Als die beiden meist etablierten Verfahren gelten einerseits die Wanderung der Zellen auf Agarplatten (Cuttler 1974, Nelson et al. 1975) und andererseits die Wanderung der Zellen durch einen Membranfilter (Boyden 1962). Die Boydenkammer besteht aus zwei Kammeranteilen, die durch einen Filter getrennt sind. Kammer, Filter als auch chemotaktisch wirksamer Stoff sind mehrmals modifiziert worden (Ward et al. 1965, Cornley 1966, Swanson 1977).

5.2.3.2 Beschreibung der benutzten Kammer

In unseren Untersuchungen benutzten wir eine Kammer mit 48 Untereinheiten (20). Somit können auf einem Filter gleichzeitig mehrere Zellproben beurteilt werden. Als weiteren Vorteil dieser Kammer muß erwähnt werden, daß nur eine geringe Anzahl an Zellen (5×10^5 /ml) und nur 25 μ l chemotaktischen Agens je Probe benötigt werden.

5.2.3.3 Beschreibung der Filter

Es werden hauptsächlich zwei Arten von Filtern benutzt: Polycarbonat - Filter (10 μ m dick) und Zellulose - Filter (100 - 150 μ m dick). Wegen der Dicke wird Ersterer wohl vorgezogen, da bei diesem die gewanderten Zellen leichter in einer optischen Ebene aufgefunden und somit gut morphologisch differenziert werden können. Als Nachteil aller Filter galt, daß die gewanderten Zellen leicht wieder abfallen.

Harvarth (24) fand heraus, daß sich bei Polyvinylpyrrolidon freien Polycarbonat - Filtern die Zellen schwerer ablösen. Diese Art von Filtern wurde in der vorliegenden Studie verwandt.

5.2.3.4 Beschreibung der chemotaktischen Substanzen

Neben dem von uns benützten chemotaktischem Peptid N - Formyl - Methionin - Leucin - Phenylalanin (FMLP) werden das Komplementspaltprodukt C_{5a} und Faktoren aus Zellwänden von E.coli Bakterien als chemotaktisch aktive Substanzen verwandt.

Das Peptid hat seine beste Wirkstoffkonzentration bei 10^{-6} mol, während C_{5a} bei 10^2 bis 10^3 Molarität die meisten Zellen anzieht. Harvarth fand, daß bei optimaler Konzentration von FMLP 20 - 30% der Zellen, bei C_{5a} 40 - 50% wandern (24).

5.2.4 Änderung der Chemotaxis von PMN - Granulocyten in der CPDA₁ - Vollblutkonserve

Nachdem die Phagocytosefähigkeit über einen Zeitraum von 3 - 4 Tagen fast unverändert bleibt, wurde als weiterer Funktionsparameter die Chemotaxis in vitro untersucht.

Mc. Cullough (14) fand 1974 bei Granulocytenkonzentraten, die in verschiedenen Stabilisatoren bei 4°C gelagert wurden, nach 24 Stunden nur einen geringen Abfall der Chemotaxis (12% bei CPD; 26% bei Heparin). Dies konnte durch Untersuchungen von Crowley (11) und Lane (28) bestätigt werden. Steigbigel (45), der Granulocyten, die entweder durch continuous - flow - centrifugation (CFC) oder durch filtration leukapheresis (FL) gewonnen wurden, in ihrer Chemotaxis verglich, konnte aufzeigen, daß verschiedenartige Separationsverfahren keinen Einfluß auf die Chemotaxis haben. Auch in dieser Untersuchung fand sich nach einem Tag nur geringer Funktionsverlust.

Nach 48 Stunden konnte Mc Cullough nur noch geringfügige chemotaktische Aktivität feststellen, die nach 72 Stunden vollständig verschwunden war. ACD und CPD erwiesen sich dabei als beste Stabilisatoren der Granulocytenkonzentrate (14).

Als Ursache für das frühe Ausfallen der Chemotaxis vermutete Mc Cullough einen Abfall des ATP - Spiegels in der Konserve (15). ATP dient als Energielieferant für kontraktile Prozesse, die durch Aneinandergleiten von Aktin- und Myosinfilamenten hervorgerufen werden. Unter Lagerung bei 1-6°C fielen Chemotaxis und ATP - Spiegel nach 24 Stunden um 30%.

Bei Lagerung zwischen 20° - 24°C fand sich dagegen nur ein Abfall von ca. 10%. Nach 48 Stunden fiel die chemotaktische Fähigkeit in beiden Temperaturbereichen deutlich ab, wobei auch zu diesem Zeitpunkt $20-24^{\circ}$ Lagerungstemperatur bessere Funktionstüchtigkeit gewährleistete.

Auch die Tatsache, daß die Chemotaxis der Granulocyten bei Patienten mit Hypophosphatämie und niedrigem leukocytärem ATP - Spiegel abgeschwächt ist und sich dieser Funktionsabfall durch Gabe von Phosphat und Adenin normalisieren kann (10), spricht für die zentrale Rolle des ATP für die Chemotaxis.

Als weiteren Faktor für den vorangehenden Verlust der Chemotaxis führte Palm die Zerstörung des granulocytären Zytoskeletts durch Kälte (4°C) an.

Durch einen fast vollständigen Verlust an Mikrotubuli und Mikrofilamenten geht die Fähigkeit der Wanderung bzw. des Anheftens an fremde Oberflächen verloren (40). Somit ist wohl auch der Unterschied zu erklären, der bei den unterschiedlichen Lagerungstemperaturen auftritt.

1981 untersuchte Mc Cullough die in vivo Funktion gelagerter Granulocyten (16). Es zeigte sich bei 24 Stunden gelagerten Granulocyten ($1^{\circ}-6^{\circ}\text{C}$ bzw. $20^{\circ}-24^{\circ}\text{C}$) bei beiden Lagerungstemperaturen eine signifikant niedrigere intravaskuläre Erholungsrate und Wanderung zu Hautfenstern im Vergleich zu frischen Granulocyten. Schon bei 8 Stunden Lagerung waren unter $1^{\circ}-6^{\circ}\text{C}$ beide Parameter abgeschwächt. Die unter $20^{\circ}-24^{\circ}\text{C}$ gelagerten Granulocyten konnten sich dagegen nach 8 stündiger Lagerung erholen und zeigten eine gute in vivo Chemotaxis.

In den acht von uns untersuchten CPDA₁ - Vollblutkonserven fand sich erst nach 48 Stunden ein signifikanter Abfall der Chemotaxisfähigkeit. Möglicherweise ist diese Diskrepanz zu den Voruntersuchungen durch den Zusatz von CPDA₁, insbesondere von Adenin, als Stabilisator zu erklären.

Der für die Funktion von Granulocyten aus Vollblutkonserven limitierende Parameter dürfte somit die Chemotaxis sein. Ihr Verlust nach 48 Stunden

- hervorgerufen durch die Lagerungstemperatur und durch den Abfall von ATP - geht dem Verlust der Fähigkeit zur Phagocytose, der Abtötung von Bakterien durch toxische O₂ Produkte und der Aktivierung des Hexose - Monophosphat - Shunts durch O₂ Verbrauch deutlich voraus (37).

5.3 Aktivierung des Komplementsystems in der CPDA₁ - Vollblutkonserve

5.3.1 Die Komplementkaskade und ihre Aktivierung

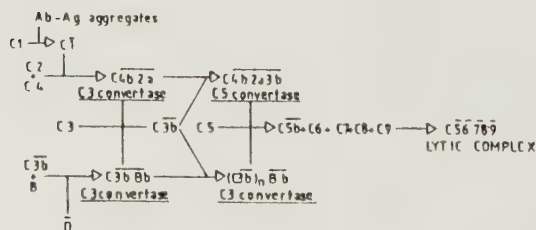
Die biologische Aufgabe des hitzelablen Komplementsystems liegt in der Abwehr von Infektionen von Mikroorganismen, die zusammen mit Antikörpern und Abwehrzellen erfolgt (9). Aktivierbare Produkte des Komplementsystems führen zur Lysis von zellulären Antigenen, ziehen phagocytierende Zellen zu den Stellen der Infektion (C_{5a}) und ermöglichen die Aufnahme und Zerstörung der Antigene (34).

Die Aktivierung der Komplementkaskade erfolgt über 2 Wege: the classical pathway und the alternative (properdin) pathway. Auf beiden Wegen kommt es zu einer Spaltung des Komplementfaktors C₃ durch die C₃ convertase in C_{3a} und C_{3b}.

Antigen - Antikörper Komplexe oder zellgebundene Antigene führen zur Aktivierung des classical pathways, der die Faktoren C_1, C_4, C_2 einschließt. Der alternative pathway wird durch Polysaccharide (Zymosan) oder Lipopolysaccharide aus Bakterienzellwänden, durch aggregiertes Ig A und anderen Plasmaproteinen über Aktivierung von Properdin und den Faktoren D und B eingeleitet (35). Plasmin, leukocytaire Elastase, Trypsin und andere mikrobielle Proteasen führen ebenfalls zur Spaltung von C_3 (34).

Abbildung 22 zeigt das Zusammenspiel beider Aktivierungswege.

Faktor C_{3b} , der sowohl Rezeptoren für die Aktivierung aus den alternative pathway als auch für die Inaktivierung durch C_{3b} inactivator trägt, dient zur Opsonierung von Bakterien und anderen Partikeln (44). In der Komplementkaskade führt er zur Aktivierung von C_5 , indem er sich mit dem Komplex C_4b_2 zu $C_4b_2C_3b$ convertase verbindet, die nun C_5 in C_5a und C_5b spaltet. Dieser Vorgang ist nun der letzte proteolytische Prozeß im Komplementsystem. Der aktivierte Faktor C_5b verbindet sich spontan mit C_6, C_7, C_8 und C_9 zu einem membranporenbildenden, zytolytischen Komplex. Für sich alleine zeigen letztgenannte Faktoren keine Wirkung (35).



5.3.2 Stoffwechselwirkungen von C_{3a} und C_{5a}

C_{3a} und C_{5a} rufen mannigfaltige celluläre Reaktionen hervor: aus Mastzellen setzen sie Histamin frei, Leukocyten werden zur Chemotaxis und Degranulierung von Enzymen (speziell Hydrolasen) angeregt, die Kapillarpermeabilität wird erhöht; sie führen zur Kontraktion glatter Muskulatur (34).

Da sie bei systemischer Verabreichung zu einem Beschwerdebild führen, das dem anaphylaktischen Schock gleicht (34), werden sie zu den anaphylaktoiden Substanzen gezählt. C_{3a} und C_{5a} werden durch die Carboxypeptidase zu C_{3a} des Arg bzw. C_{5a} des Arg abgebaut. Durch die Abspaltung des N - terminalen Argininrestes verlieren beide Proteine ihren anaphylaktischen Charakter (55).

5.3.3 Stoffwechselwirkungen von C_{3a} des Arg und C_{5a} des Arg

Aber auch C_{3a} des Arg. behält biologische Aktivität. So fördert C_{3a} des Arg in vitro bereits in Konzentrationen von weniger als 1 ng/ml die Thrombocytenaggregations und die Serotoninfreisetzung aus Thrombocyten (42). In Konzentrationen von 1 µg/ml hemmt es wie C_{3a} die zytolytische Aktivität der "natural killer cells" in vitro (3).

C_{5a} des Arg verliert wie C_{3a} des Arg durch die Abspaltung die anaphylaktoide Eigenschaft. Im Hinblick der Wirkung auf Granulocyten, wie der Degranulierung lysosomaler Enzyme oder als chemotaktischer Faktor, unterscheidet sich C_{5a} des Arg von C_{5a} nur quantitativ, aber nicht qualitativ (55).

5.3.4 Konzentrationsverlauf von C_{3a} des Arg und C_{5a} des Arg in der CPDA₁ - Vollblutkonserve unter Lagerung

Über die Anwesenheit von Komplementfaktoren und ihrer Spaltprodukte im gelagerten Blut ist wenig bekannt.

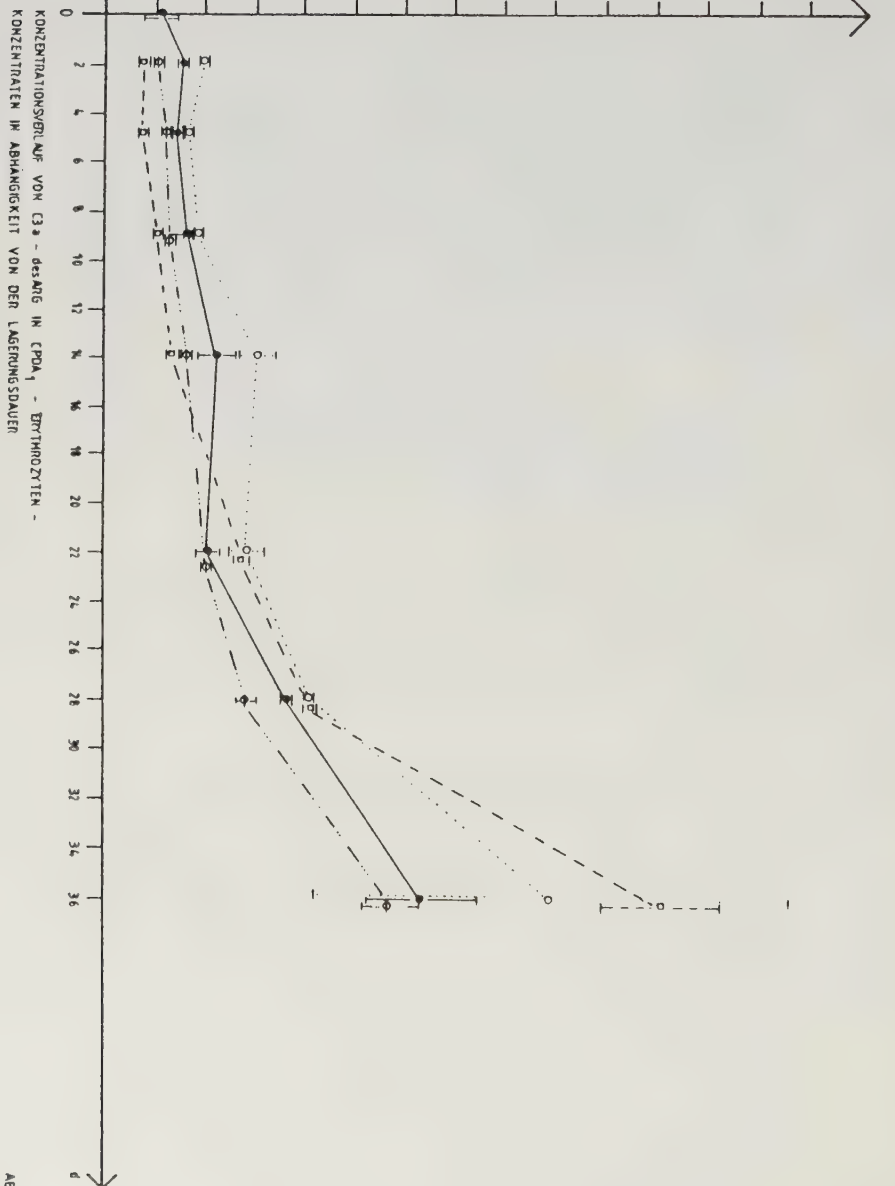
Aktiviertes Komplement soll zum ARDS - Syndrom (adult respiratory distress syndrom) führen (Hammerschmidt et al 1980) und zu Komplikationen nach Operationen an der Herz - Lungenmaschine beitragen (Chenoweth et al.1981(5)).

Schifferli et al. untersuchten 1982 in 10 CPD - Vollblutkonserven über den Zeitraum von 3 Wochen die Funktionen des Komplementsystems, die Spaltprodukte von C_3 und die Aggregation von Immunkomplexen (46). Dabei ergab sich ein signifikanter Anstieg des C_3 Spaltproduktes C_{3d} und ein Abfall der durch das Komplementsystem vermittelten Auflösung von Immunpräzipitaten. Die Studie zeigte aber auch, daß das Komplementsystem nach 3 Wochen Lagerungszeit in Blutkonserven noch aktiv ist. Die Aktivität von C_{3b} , bestimmt durch die Fähigkeit der Opsonierung und zur Hämolyse bleibt in ACD - und CPD -Konserven erhalten (Mc Cullough et al.1972; Mc Clellan, Alexander 1977).

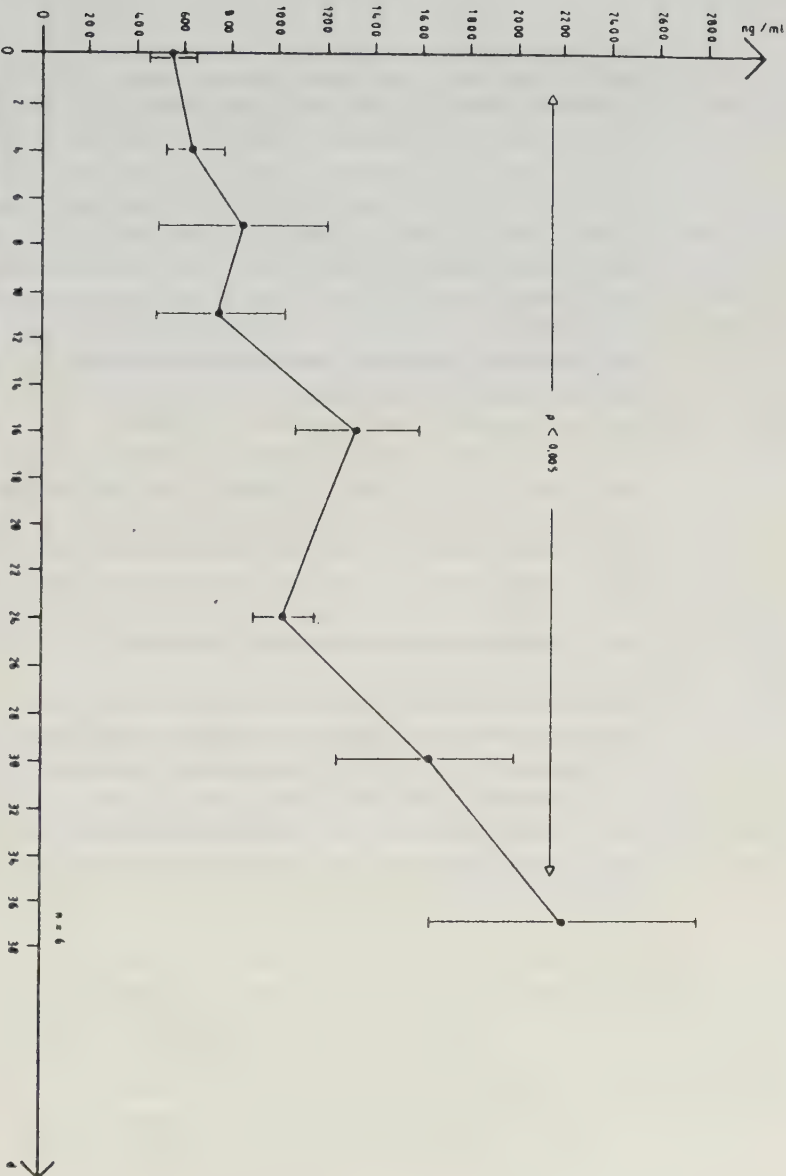
An Hand eines Radioimmunoassays untersuchten wir die Konzentration von C_{3a} des Arg und C_{5a} des Arg in CPDA₁ Vollblutkonserven, wobei uns keine Voruntersuchungen bekannt sind. Bereits nach 10 Tagen fand sich ein hochsignifikanter Konzentrationsanstieg von 125 ± 42 ng/ml am Tag 0 auf 543 ± 299 ng/ml am Tag 10. Im Zeitraum von 2 Wochen stellte sich kein Plateau ein. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den im selben Institut durchgeführten Untersuchungen an 4 CPDA₁ - Erythrocytenkonzentraten und 6 PAGGS Erythrocytenkonzentraten (3 Beutelsystem der Fa. Biotest), wie die Abbildungen 22 und 23 zeigen (47). Ein entsprechender Anstieg von C_{5a} des Arg. konnte nicht nachgewiesen werden.

Allerdings sind bei der relativ großen Streuung der Einzelwerte, wobei einige Werte außerhalb des Meßbereiches des RIAS lagen, die Anzahl der untersuchten Proben pro Tag vielleicht zu gering gewesen, um eine sichere Aussage über den Konzentrationsverlauf machen zu können.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Aktivierung von C_5 könnte in rascher Inaktivierung von C_{3b} liegen, so daß kaum C_5 convertase entsteht. Ob daraus sich auch auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung von C_{3a} zu C_{3a} des Arg schließen läßt, bleibt offen.



KONZENTRATIONSENTWICKLUNG VON C3a - DERIVAT IN PAGET - EITROZOTTEN -
KONZENTRATIONEN IM ABHÄNGIGKEIT VON DER LIEGENDESDAUER (MW ± 2°C)



Da es anscheinend während der Lagerung zu einer Aktivierung der Komplementkaskade kommt, stellt sich die Frage, über welchen Aktivierungsweg dies erfolgt. Im Gegensatz zum alternative pathway ist der classical pathway Calcium abhängig (35). Da die Blutkonserven aber Citrat als Calciumbinder enthalten, scheint dieser Weg unwahrscheinlich. Darüberhinaus konnte keine Korrelation zwischen dem Konzentrationsverlauf des C_3 Aktivatorkomplexes des classical pathways zum Konzentrationsanstieg von C_{3a} des Arg gefunden werden. Mittels radialer Immundiffusion wurde in CPDA₁ Vollblut bei 72 Stichproben der C_3 - Aktivator-komplex bestimmt.

Zwar zeigte sich nach 4 Tagen ein Konzentrationsanstieg, der an der Signifikanzschranke lag, im weiteren Verlauf waren die Konzentrationsunterschiede nicht mehr signifikant. Auch bei den Erythrocytenkonzentrationen ging dem Anstieg von C_{3a} des Arg kein Anstieg des C_3 Aktivatorkomplexes einher (47).

Somit erscheint es wahrscheinlich, daß die Aktivierung über den alternative pathway erfolgt. Dies könnte über 2 Mechanismen geschehen. Zum einem ist bekannt, daß granulocytäre Elastase zu einer Aktivierung des alternative pathways führt (44) und zum anderen ist eine Aktivierung durch Kontakt mit Glas - und Plastikoberflächen beschrieben (25, 48).

5.3.5 Konsequenzen aus der erhöhten Konzentration von C_{3a} des Arg in älteren Vollblutkonserven

Die nachgewiesenen erhöhten Konzentrationen an C_{3a} des Arg in 10 Tage alten Vollblutkonserven werfen die Frage auf, ob diese Konzentrationen an C_{3a} des Arg zu Auswirkungen auf Thrombocyten oder Lymphocyten nach Bluttransfusionen führen. Vielleicht sind diese erhöhten Konzentrationen für postoperative Embolien und Lungenfunktionsstörungen, die nach Operationen auftreten, in denen größere Mengen an Vollblut gegeben wurde, verantwortlich.

5.4 Granulocytäre Enzyme in der CPDA₁ Vollblutkonserve

Menschliche PMN - Leukocyten enthalten große Mengen im neutralen pH wirksamer Proteasen, die frei werden, wenn Granulocyten einem phagocytischen Stimulus (z.B. endotoxintragende Bakterien) ausgesetzt sind. Bei entzündlichen Erkrankungen verursacht das lokale Ungleichgewicht zwischen Proteinase und den vorhandenen Proteinaseinhibitoren Gewebsschäden - Spaltung von Elastin, Kollagen, Proteoglykanen - und den Abbau von Plamaproteinen, wie Ig G, C_3 , C_5 und Gerinnungsfaktoren (17).

Ein erhöhtes Auftreten von Granulocytanelastase im Plasma wurde bei Patienten mit Septikämie oder myeloischer Leukämie (19, 39), in der Peritonealflüssigkeit von Patienten mit Peritonitis (38), im Sputum von Patienten mit Bronchitis (51) und in Synovialexsudaten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (33) beschrieben.

Für das Auftreten von Störungen der Hämostase und der Entwicklung eines ARDS Syndroms nach massiven Bluttransfusionen wurde immer wieder der erhöhte Spiegel an cytotoxischen Mediatoren verantwortlich gemacht (23).

Jochum et al. untersuchten deshalb in 10 ACD - Konserven den Verlauf der Konzentration lysosomaler granulocytärer Enzyme wie Elastase, saure Hydrolase, Galactosidase, Glucoronidase und saurer Phosphatase über einen Zeitraum von 3 Wochen (26). Die saure Hydrolase erreichte nach 14 Tagen, die Elastase nach 21 Tagen das Maximum ihrer Konzentration. In unseren Untersuchungen stellte sich ein kontinuierlicher Anstieg aller untersuchten granulocytären Enzyme in den Konserven über 7 Tage ein.

Diesem Anstieg parallel verlief die Konzentration der Lactatdehydrogenase, die normalerweise hauptsächlich im Cytoplasma vorliegt. Dieser Anstieg der LDH ist wahrscheinlich durch Zelluntergang bedingt.

Um herauszufinden, ob der Anstieg der granulocytären Enzyme im Vollblut in spontaner Degranulierung oder im Zellzerfall seine Ursache hat, untersuchten wir die Konserven nach Zugabe von E. coli Endotoxin, das zur spontanen Degranulierung führt, nochmals.

Am Tag der Konservenherstellung kam es durch Endotoxinzugabe zu einer 5 fachen Steigerung der Elastasekonzentration und zu einer 4 fachen Steigerung der Myeloperoxidasekonzentration in der Konserve. Laktoferrin, das am schnellsten durch Endotoxin freigesetzt wird, stieg um das 10 fache des Spontanwertes an. Über den Verlauf von 7 Tagen glichen sich spontane und stimulierte Enzymkonzentrationen bei allen drei Enzymen an. Dies bedeutet, daß in den ersten Tagen eine deutliche Steigerung der spontanen Enzymfreisetzung durch Endotoxinstimulierung eintreten kann, daß die Zellen aber nach 7 Tagen - dem Zeitraum des vollkommenen Verlustes der Phagocytosefähigkeit - nicht mehr stimuliert werden können und daß die hohe Konzentration granulocytärer Enzyme zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich auf Zelluntergang beruht.

Da aber die Enzymbestimmung mittels Enzymimmunoassay über den Komplex mit Proteinaseinhibitoren durchgeführt wurde, ist es nicht zu klären, ob überhaupt proteolytisch wirksame Enzyme in der Vollblutkonserve vorliegen und ob es über diesen Weg zur Aktivierung des Gerinnungs - und Komplementsystems kommt. Welche Auswirkungen die in der Konserve nachgewiesenen Stoffwechselprodukte auf den Organismus haben, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

In CPDA₁ Vollblutkonserven fällt bei PMN-Granulocyten als erstes nach 48 Stunden die Fähigkeit ab, zu entzündlichen Stimuli zu wandern (Chemotaxis), wobei Lagerung bei Raumtemperatur und sorgfältige pH - Regulierung zu länger andauerndem Funktionserhalt führen (31). Gleichzeitig nehmen die Rezeptoraffinität für chemotaktische Substanzen (29), die Adhärenzfähigkeit (40), der Energiestoffwechsel und die Glykogenolyse (15) deutlich ab. Weiterhin kommt es zu einer spontanen, zunächst langsamen Freisetzung von lysosomalen Enzymen (56) aus den Granulocyten, die zwar durch Protease-Inhibitoren in ihrer Toxizität sicherlich abgeschwächt werden, aber durchaus in der Lage sind; Stoffwechselvorgänge wie die Bildung von Anaphylatoxinen C_{3a} und C_{5a} anzustoßen.

Mit dem Verlust der Phagocytosefähigkeit nach 4 bis 5 Tagen setzt dann gleichzeitig die Lyse der Granulocyten, die einhergeht mit dem deutlichen Anstieg der lysosomalen Enzyme und der LDH, ein.

Im Hinblick auf die Funktion von PMN - Granulocyten in CPDA₁-Vollblutkonserven ist klar herauszustellen, daß die Chemotaxis der zeitlich limitierende Faktor ist und daß somit die Konserven nicht älter als 2 Tage sein sollten, wenn ein therapeutischer Nutzen aus der Gabe dieser Zellen gezogen werden soll. Ob in vivo Auswirkungen der nach 4 -7 Tagen durch Zelluntergang bedingten erhöhten granulocytären Proteasen-Konzentration auftreten oder ob diese durch Gegenmechanismen, wie z.B. durch Proteinaseinhibitoren aufgehalten werden, muß weiteren Untersuchungen überlassen werden.

Literaturverzeichnis

1. Block L.H., Lüthy R., Siegenthaler W.: Oxidativer Metabolismus von Phagocyten : Physikochemische Grundlagen und klinische Relevanz. Klin.Wochenschr., 58, S.1271-1281 (1980)
2. Bridges C.G., Yamamura M., Valdimarsson H.: Polymorph-nuclear leukocyte function after storage. The Lancet, February 4th 1978
3. Chaurriaut Ch. : Inhibition of in vitro natural killer activity by the third component of complement : Role for the C_{3a} fragment, Immunology, Vol.79, p.6003-6007 (12/1982)
4. Chenoweth D.E., Rowe J., Hugli T.E.: A modified method for chemotaxis, Journal of immunological methods, 25, p.337 - 353 (1979)
5. Chenoweth D.E.: Complement activation during cardiopulmonary bypass; evidence for generation of C_{3a} and C_{5a} anaphylatoxins. The New England Journal of Medicine, Vol.304, No.9, p.497-503, February 26th 1981
6. Clawson C.C., Repine J.E.: Quantitation of maximal bactericidal capacity in human neutrophils. J. Lab. Clin. Medicine, 88, p.316 (1976)
7. Cohen H.J., B.M. Babior : Measurement of Neutrophil Function: Phagocytosis, Degranulation, the Respiratory Burst and Bacterial Killing, Chapter 1, p.1-38 (1981)
8. Collins J.A. : Problems associated with the massive transfusion of stored blood. Surgery, Vol.75, No.2, p.274-291 (1974)
9. Cooper N.R., Cochrane Ch.G. : The biochemistry and biologic activities of the complement and contact system. In "Hematology", W. Williams, Chapter 15, p.98 (1983)
10. Craddock P.R.: Acquired phagocyte dysfunction; a complication of the hypophosphatemia of parenteral hyperalimentation. New England Journal of Medicine, 200, p.1403 (1974)

11. Crowley J.P., Valeri C.R.: Recovery and function of granulocytes in plasma at 4 C for one week. Transfusion, Vol.14, No.6, p.574-579 (11/1974)
12. Mc. Cullough J., Yunis E.D., Benson S.J., Quie P.G.: Effect of blood bank storage on leucocyte function. Lancet, p.1333, Dec.20th 1969
13. Mc Cullough J., Carter S.J., Quie P.G.: Effects of anticoagulants and storage on granulocyte function in bank blood. Blood, 43, p.207-217 (1974)
14. Mc Cullough J., Weiblein B.J., Quie P.G.: Chemotactic activity of human granulocytes preserved in various anticoagulants, J.Lab.Clin.Med., Vol.86, No.6, p.902-905 (12/1974)
15. Mc Cullough J., Weiblein B.J.: The relationship of granulocyte ATP to chemotactic response during storage. Transfusion, Vol.19, No.6, p.764-767 (12/1979)
16. Mc Cullough J., Weiblein B.J., Fine D.: Effects of storage of granulocytes on their fate in vivo. Transfusion, Vol.23, No.1, p.20-24 (1983)
17. Diagnostica Merck : PMN Elastase; Die neue Dimension in der Entzündungsdiagnostik
18. Duswald K.H., Jochum M., Fritz H., Schweiberer L.: Verminderte in vitro Freisetzung von Elastase aus Granulocten bei Sepsis nach abdominal - chirurgischen Operationen. Chirurgisches Forum '83 für experim. u. klinische Forschung, Springer, Berlin Heidelberg 1983
19. Egbring R., Schmidt W., Fuchs G., Havemann K.: Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. Blood, 49, p.219-231 (1977)
20. Falk W., Goodwin R.H., Leonard E.J.: A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leucocyte migration. Journal of Immunological Methods, 33, p.239-247 (1980)
21. Friedberger E. : Weitere Untersuchungen über Eiweißanaphylaxie IV.Mitteilung.Z.Immunitätsforschung, 4, S.636 (1910)

22. Gee A.P. : Advantages and limitations of methods for measuring cellular chemotaxis and chemokinesis. *Mol. and Cell. Biochemistry*, 62, p.5-11 (1984)
23. Harke H. : Massivtransfusionen; Hämostase und Schocklunge. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New-York 1982
24. Harvath L., Falk W., Leonard E.J.: Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: Use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *Journal of Immunological Methods*, 37, p.39-45 (1980)
25. Hed J., Johansson M., Lindroth M.: Complement activation according to the alternative pathway by glass and plastic surfaces and its role in neutrophil adhesion. *Immunology Letters*, 8, p.295-299 (1984)
26. Jochum M., Mempel W., Fritz H.: Release of granulocytic lysosomal enzymes and concentrations of plasma factors in stored blood
27. Jochum M., Duswald K.-H.: Proteinases and their inhibitors in septicemia - basic concepts and clinical implications. *Proteases*; Edited by Walter H. Hörl and August Heidland, Plenum Publishing Corpor. 1984
28. Lane T.A. : Storage of granulocyte concentrates : bacterial killing and chemotaxis. *Transfusion*, Vol.18, No.5, p.650 (10/1978)
29. Lane T.A., Windle B.E.: Decreased affinity for a chemotactic factor in stored granulocyte concentrates. *Transfusion*, 21, p.450-456 (1981)
30. Lane T.A., Lamkin G.A.: Defective energy metabolism in stored granulocytes. *Transfusion*, Vol.22, No.5, p.368-373 (1982)
31. Lane T.A., Lamkin G.A.: The effect of storage on degranulation by human neutrophils. *Transfusion*, Vol.25, No.2, p.155-161 (1985)

32. Masouredis S.P. : Preservation and clinical use of erythrocytes and whole blood. "Hematology", W.Williams, Beutler E., Erslev A., Lichtmann M., Chapter 164, p.1529 (1983)
33. Menninger H., Putzier R., Hartmann F.: Die Bedeutung von Proteasen für die rheumatische Gelenkdestruktion. Verh. Dtsch. Ges. Rheumatol. 6, S.229 (1980)
34. Müller -Eberhard H.J. : The serum complement system. Textbook of Immunopathology, Miescher P. Müller - Eberhard H.J., Edited by Grune/Straton, Chapter 4, p.45 (1976)
35. Müller-Eberhard H.J., Schreiber R.D.: Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement. Immunology, Vol.29, p.1-53 (1980)
36. Neumann S., Henrich N., Gunzer G., Lang H.: Enzymmarkierter Immunoessay zur Bestimmung von menschlicher Granulocyteneelastase als a_1 Proteinase-inhibitor - Komplex. In "Proteases, Potential role in health and disease" W.H.Hörl, A.Heiland, Plenum Press, p.379-390 (1984)
37. Nusbacher J.: Preservation and clinical use of leukocytes. "Hematology", Williams W., Chapter 165, p.1549 (1983)
38. Ohlsson K. : Collagenase and elastase released during peritonitis are complexed by plasma protease inhibitors. Surgery , 79, p.652 (1976)
39. Ohlsson L., Olofsson T., Ohlsson K., Gustavsson A.: Serum and plasma myeloperoxidase, elastase and lactoferrin content in acute myeloid leukemia. Scand. J. Haematol., 22, p.397 (1979)
40. Palm S.L., Furcht L.T., Mc Cullough J.: Effects of temperature and duration of storage on granulocyte adhesion, spreading and ultrastructure. Lab. Invest., 45, p.82-88 (1981)

41. Peterson P.K., Verhoef J., Sabath L.D., Quie P.G.: Extracellular and bacterial factors influencing staphylococcal phagocytosis and killing by human polymorphnuclear leukocytes. *Infection and Immunity*, Vol.14, No.2., p.496-501 (8/1976)
42. Polley M.J., Nachman R.L.: Human platelet activation by C_{3a} and C_{3a} -des Arg. *Journal Exp. Med.* Vol.158, p.603-615 (8/1983)
43. Price T.H., Dale D.C.: Neutrophil preservation - The effect of short-term storage on in vivo kinetics. *Journal of Clinical Investigation*, Vol.59, p.475-480 (3/1977)
44. Reid K., Porter R.P.: The proteolytic activation systems of complement. *Annual Reviews Biochemistry*, 50, p.433-466 (1981)
45. Rick W.: *Klinische Chemie und Mikroskopie* Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 5. Auflage 1977
46. Schifferli J.A., Boralessa H., Howarth H.L., Whitwam J.G., Rees A.J.: Complement in CPD - stored blood. *Vox sanguinis*, 42, p.198-202 (1982)
47. Schleuning M., Wimmer R., Eckstein R., Mempel W.: Elevated levels of C_{3a} -des Arg after storage of blood products under normal blood bank conditions. *Blood, Journal of Experimental and Clinical Hematology*, Vol.51, No.3, p.204 (1985)
48. Sevast'yanov V.I., Iseytina E.A.: The activation of the complement system by polymer materials and their blood compatibility. *Journal of Biomed. Mat. Research*, Vol.18, p.969-978 (1984)
49. Silber R., Moldow Ch. F. : *Biochemistry and function of neutrophils - Composition of neutrophils. "Hematology"*, W. Williams, 3rd Edition, Chapter 81, p.726 (1983)

50. Steigbigel R.T., Baum J., Mac Pherson J.L., Nusbacher J.: Granulocyte bactericidal capacity and chemotaxis as affected by continuous-flow centrifugation and filtration leukapheresis, steroid administration, and storage. *Blood*, 52, p.197 (1978)
51. Stockley R.A., Burnett D.: Alpha₁-antitrypsin and leukocyte elastase in infected and noninfected sputum. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 120, p.1081 (1979)
52. Upjohn diagnostics : Human Complement C_{3a}des Arg Radioimmunoassay Kit (¹²⁵J) (11/1982)
53. Upjohn diagnostics : Human Complement C_{5a}des Arg Radioimmunoassay Kit (¹²⁵J) (11/1982)
54. Venge P. : Polymorphonuclear leukocyte proteases and their effects on complement components and neutrophil function. *Neutrophil Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes*, Edited by Klaus Havemann and Aaron Janoff, Urban Schwarzenberg, Inc. Baltimore-Munich 1978
55. Webster R.O.: Biological effects of the human complement fragments C_{5a} and C_{5a}des Arg on neutrophil function. *Immunopharmacology*, 2, p.201-219 (1980)
56. Wright D.G., Malawista S.E.: The mobilisation and extracellular release of granular enzymes from human leukocytes during phagocytosis. *J. Cell. Biol.*, 53, p.788-797 (1972)

Danksagungen

Allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit mitgewirkt haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Mempel, der mir als Leiter des Bluttransfusionszentrum München Großhadern nicht nur Thema, Arbeitsplatz und Material zur Verfügung stellte, sondern mir auch jederzeit mit wertvollen Anregungen hilfreich zur Seite stand.

Besonderen Dank schulde ich auch Herrn Dr. med. Michael Schleuning für seine Unterstützung, Anregungen und stimulierenden Diskussionen während der gesamten Arbeit, die insbesondere durch sein engagiertes Zutun bestimmt war.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Beloradsky in der Haunerschen Kinderklinik mit seinen Mitarbeiterinnen und Frau Dr. Jochums in der Abteilung für klinische Chemie und klinische Biochemie der LMU -München mit Mitarbeitern möchte ich mich ebenfalls für bereitgestellte Arbeitsplätze und großzügige Unterstützung recht herzlich bedanken.

Allen Mitarbeiteren und Angestellten des Transfusionszentrums München - Großhadern danke ich für ihre Mitarbeit und insbesondere für die freundschaftliche Atmosphäre in der Abteilung.

Lebenslauf

- 30.Dezember 1959 Geboren als 1. Kind des Ehepaars Lorenz Wimmer und Antonia Wimmer
- 1966 - 1970 Besuch der Grundschule in München - Pasing
- 1970 - 1979 Besuch des humanistischen Gymnasiums
- 1979 Abitur am Karls gymnasium in München - Pasing
- 1979 Aufnahme des vorklinischen Studiums der Humanmedizin an der Universität Regensburg .
- 8/1981 Ärztliche Vorprüfung an der Universität Regensburg
- 11/1981 Wechsel zum klinischen Studium an die Ludwigs - Maximilians Universität München
- 8/1982 Erster Teil der ärztlichen Prüfung an der LMU - München
- 3/1985 Zweiter Teil der ärztlichen Prüfung an der LMU - München.
- 4/85-7/85 Praktisches Jahr - Gynäkologie am Kreis-krankenhaus Starnberg
- 8/85-11/85 Praktisches Jahr - Innere Medizin am Städtischen Krankenhaus München Harlaching
- 12/85-3/86 Praktisches Jahr - Chirurgie an der Universität München - Großhadern
- 4/86 Dritter Teil der ärztlichen Prüfung an der LMU - München
- 6/86-11/86 Assistenzarzt Tätigkeit in einer internistischen Facharztpraxis in München
- 12/86 Assistenzarzt Tätigkeit Innere Medizin in der Buchbergklinik Bad Tölz

